

Untersuchungen zu Naturstoff-Biosynthesen von Basidiomyceten der Ordnung Agaricales

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Jonas Wick

geboren am 24.02.1988 in Göttingen

Die Arbeiten zur Erlangung des akademischen doctor rerum naturalium wurden im Zeitraum von Mai 2015 bis Mai 2018 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter der Leitung von Prof. Dr. Dirk Hoffmeister angefertigt.

Tag der Einreichung:

Gutachter:

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Basidiomyceten und ihre ökologische Bedeutung.....	1
1.2	Die kulturelle Bedeutung der Basidiomyceten.....	2
1.3	Biologisch aktive Naturstoffe aus Basidiomyceten	4
1.3.1	Biosynthese der Sekundärmetabolite	6
1.4	Charakterisierung von Biosyntheseenzymen aus Basidiomyceten	7
1.4.1	Das Auffinden schwer identifizierbarer Biosyntheseenzyme	11
2	Zielsetzung.....	19
2.1	Untersuchung der Melleolid-Biosynthese in <i>Armillaria mellea</i>	19
2.2	Untersuchung der Psilocybin-Biosynthese in <i>Psilocybe cubensis</i>	19
2.3	Untersuchung der Glutamytransferase aus <i>Agaricus bisporus</i>	19
3	Publikationen.....	20
3.1	Publikation 1, Wick et al. (2016), <i>Applied and Environmental Microbiology</i>	20
3.2	Publikation 2, Lenz et al. (2017), <i>Journal of Natural Products</i>	33
3.3	Publikation 3, Fricke et al. (2018), <i>Chemistry – A European Journal</i>	45
3.4	Publikation 4, Blei et al. (2018), <i>ChemBioChem</i>	53
4	Unveröffentlichte Ergebnisse	75
4.1	Arbeiten an Indolalkaloiden aus <i>Psilocybe</i> spp. und <i>Amanita citrina</i>	75
4.1.1	Ergebnisse.....	76
4.1.2	Methoden.....	97
4.2	Arbeiten an <i>Agaricus bisporus</i>	117
4.2.1	Ergebnisse.....	117
4.2.2	Methoden.....	119
5	Diskussion	122
5.1	Biosynthese der Melleolide	122
5.2	Biosynthese des Psilocybins und des blauen Farbstoffes	123
5.3	Arbeiten an <i>Agaricus bisporus</i>	131
5.4	Verteidigungsmechanismen in Basidiomyceten	132

6 Zusammenfassung.....	133
7 Referenzen	135
8 Anhang.....	142
Vektorkarten	142
Gen- und Proteinsequenzen.....	144
Alignments.....	151
Abkürzungsverzeichnis	154
Abbildungsverzeichnis.....	154
Publikationen und Poster	156
Eigenständigkeitserklärung	158
Lebenslauf	159
Danksagung	160

1 Einleitung

1.1 Basidiomyceten und ihre ökologische Bedeutung

Pilze gehören wie Pflanzen und Tiere zu den eukaryotischen Lebewesen und bilden ein eigenes Reich. Zusammen mit den Tieren gehören sie zu der Übergruppe der Opisthokonta, sind mit diesen also deutlich enger verwandt als mit den Pflanzen (Adl *et al.* 2005). Landläufig werden mit Pilzen meist Basidiomyceten in Verbindung gebracht, da viele Arten, welche dieser Gruppe zuzuordnen sind, die für uns typischen, meist oberirdisch vorkommenden Fruchtkörper ausbilden. Zusammen mit den Ascomyceten („Schlauchpilze“) bilden Basidiomyceten das Unterreich der Dikarya (Hibbett *et al.* 2007).

Die ökologische Bedeutung der Basidiomyceten kann beispielhaft durch ihre Rolle in Waldökosystemen hervorgehoben werden. Saprotrophe Basidiomyceten gehören zu den Zersetzern von Totholz und sind somit ein wichtiger Bestandteil des Kohlenstoffkreislaufs. Der in Totholz gebundene Kohlenstoff liegt hauptsächlich in Form der Biopolymere Cellulose, Hemicellulose und Lignin vor. Saprotrophe Basidiomyceten sind in der Lage, diese Polymere abzubauen und den gebundenen Kohlenstoff so wieder bioverfügbar zu machen (Hatakka und Hammel 2011). Zwei am Abbau beteiligte pilzliche Enzymklassen spielen hierbei eine besonders wichtige Rolle: hydrolytische Enzyme wie Endoglucanasen und oxidative Enzyme wie Peroxidasen und Laccasen (Hatakka und Hammel 2011, Baldrian und Valaskova 2008). Viele Pilze besiedeln Pflanzenwurzeln und stehen mit diesen in mutualistischem Stoffaustausch. Dieses System nennt man Mycorrhiza. In den meisten Fällen nutzen die Pilze die Pflanze als Quelle für organischen Kohlenstoff, während die Pflanze vom Pilz aufgeschlossene, essentielle anorganische Stoffe wie Stickstoff und Phosphor sowie Wasser bezieht (Lambers *et al.* 2008). Die Symbiose über Mycorrhiza ist Normalität für die meisten Pflanzen unter den meisten ökologischen Bedingungen (Smith und Read 2008), auch da Mycorrhiza bildende Basidiomyceten sich aus saprotrophen Basidiomyceten entwickeln und mit ihren Wirtspflanzen coevolvieren (Brundrett 2002). Mycorrhiza bildende Basidiomyceten gehören dabei weitestgehend zu den Ectomycorrhizabildnern, ihre Hyphen sind also in engem Kontakt mit den Wurzeln der Pflanzenpartner, dringen jedoch nicht in diese ein. Insgesamt stellen Ectomycorrhizapilze etwa 30 % der mikrobiellen Biomasse in Böden dar (Högberg und Högberg 2002). Die Bedeutung von Ectomycorrhizapilzen für die biologische Gemeinschaft in

Waldböden wird durch neuere Studien hervorgehoben: So kann pflanzlicher, organischer Kohlenstoff nicht nur von Mycorrhizapilzen aufgenommen, sondern auch an andere Pflanzen wieder abgegeben werden (Simard *et al.* 1997). Auch scheinen verschiedene Pflanzen über das unterirdische Mycelnetzwerk der Mycorrhizapilze miteinander kommunizieren zu können (Song *et al.* 2010).

1.2 Die kulturelle Bedeutung der Basidiomyceten

Die ältesten Aufzeichnungen über den Verzehr von Pilzen stammen aus dem heutigen China, aber auch aus dem antiken Griechenland und Rom ist der hohe Stellenwert essbarer Pilze überliefert (Boa 2014). In vielen Gesellschaften, beispielsweise in weiten Teilen Mitteleuropas, dem Vereinigten Königreich und den Vereinigten Staaten von Amerika werden historisch gesehen jedoch kaum Pilze konsumiert, es herrscht eine gewisse „Mycophobie“ vor. Dem stehen „mycophile“ Gesellschaften gegenüber, in denen essbare Pilze eine tragende Rolle in der Kultur einnehmen- so z.B. in Russland, China und Japan aber auch in Mexiko der Türkei und in weiten Teilen Mittel- und Südafrikas (Boa 2014, Wasson und Wasson 1957). Die meisten Speisepilze sind nicht kultivierbar, ihr natürliches Auftreten ist unregelmäßig und sie müssen meist zeitintensiv gesammelt werden. Dies hat, neben ihren geschmacklichen Qualitäten, dazu geführt, dass einige Pilze den Status einer knappen Delikatesse innehaben. Der unter anderem in Japan als Speisepilz und als rituelles Geschenk sehr begehrte *Tricholoma matsutake* ist ein Beispiel für einen solchen Pilz (Tsing 2015). Gegenwärtig machen einige wenige, kultivierbare Arten den Großteil der weltweit gehandelten und verzehrten Pilze aus. Zu diesen gehören *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus* spp. und *Flammulina velutipes* (Valverde *et al.* 2015). Ernährungswissenschaftliche Studien bescheinigen Pilzen einen geringen Energie- und Nährstoffgehalt, welcher vergleichbar mit dem von Gemüse ist. Dennoch können Pilze durch ihren hohen Ballaststoff-, Mineral- und Vitamingehalt einen wichtigen Beitrag zu einer gesunden Ernährung leisten (Kalač 2013, Wang *et al.* 2014).

Gerade in „mycophilen“ Gesellschaften verschwimmen die Grenzen zwischen Pilzen, deren Wert allein auf ihrem Status als Nahrungsmittel beruht, und Pilzen, welchen eine gesundheitsfördernde, medizinisch relevante Funktion zugeschrieben wird, bis hin zu reinen Medizinalpilzen. Bekanntestes Beispiel mag *Ganoderma lucidum* sein. Dieser schriftlich erstmals 200 vor unserer Zeitrechnung erwähnte Pilz hat einen wichtigen Platz in der chinesischen Medizin, Kunst und Literatur und wird auch heute noch intensiv beforscht

(Valverde *et al.* 2015, Bishop *et al.* 2015). Auch in Europa gibt es Hinweise auf eine sehr frühe Verwendung bestimmter Pilze zu pharmazeutischen Zwecken durch den Menschen. So fand man bei einer ca. 5300 Jahre alten Eismumie, besser bekannt als „Ötzi“, welche 1991 gefunden wurde, einen Teil des Pilzes *Fomitopsis betulina*. Dieser wirkt toxisch auf den Darmparasiten *Trichuris trichiura*, von dem Ötzi befallen war (Capasso 1998).

Wie um andere historische Rauschmittel haben sich in verschiedenen Teilen der Welt auch mit und um berauschende Pilze Kulte entwickelt. Älteste Hinweise für den Konsum solcher Pilze sind ca. 5500 Jahre alte Wandmalereien im heutigen Südalgerien, 2500-5000 Jahre alte Bronzegegenstände und Wandmalereien der skandinavischen Halbinsel und 2500 Jahre alte, ca. 30 cm hohe steinerne Statuen, welche den Maya in Mittelamerika zugeschrieben werden. Alle Darstellungen zeigen Pilzmotive, oft in Kombination mit Menschen, in einem Zusammenhang, welcher die Verwendung der Pilze als Rauschmittel in rituellen Handlungen impliziert (Matsushima *et al.* 2009). Die am besten belegten Beispiele für den Verzehr berauschender Pilzen in rituellen Handlungen sind die Verwendung von *Amanita muscaria* durch eurasische Zirkumpolar- und nordostasiatische Kulturen (Saar 1991) sowie die Verwendung verschiedener psilocybinhaltiger Pilze durch Kulturen in Mittel- und Südamerika. Eine der ersten „westlichen“ schriftlichen Beschreibungen zur Verwendung psilocybinhaltiger Pilze als Rauschmittel ist die des Mönches Bernardino de Sahagún (1499-1590). Dieser beschrieb in seinem Werk *Historia General de las Cosas de Nueva Espana* den Konsum von Pilzen, welche „Räusche“ und „Visionen“ hervorrufen (Wasson und Wasson 1957). Dennoch dauerte es bis 1915, bis diese Pilze Beachtung in dem „westlichen“ Wissenschaftsdiskurs erhielten: Der Ethnobotaniker E. Safford ging davon aus, dass es sich bei den beschriebenen Pilzen tatsächlich um getrocknete Teile des psychoaktiven Kaktus *Lophophora williamsii* handeln müsse (Safford 1915). Dem wurde in der Folgezeit jedoch widersprochen. Der Anthropologe Robert Weitlander kam 1936 in der mexikanischen Region Oaxaca in den Besitz von Pilzen, denen eine rituelle Verwendung nachgesagt wurde. 1938 erwarb der Ethnobotaniker Richard Schultes in der Region Huautla ebenfalls Pilze, die in ähnlichem Zusammenhang standen. Bei den Pilzen handelte es sich um Vertreter der Gattung *Panaeolus*. Eine direkte Verbindung zu Pilzkulten oder zur Wirksamkeit konnte jedoch nicht gezeigt werden (Schultes 1940, Wasson und Wasson 1957). Tatsächlich wohnte erst der Anthropologe Jean Johnson 1938 mit drei Reisebegleitern einem Pilzritus bei, die dabei verwendeten Pilze wurden dabei jedoch nicht identifiziert (Johnson 1939). Dies gelang 1955 Robert Wasson, der

mit seinen Begleitern nicht nur an einer Pilzzeremonie teilnahm, sondern auch selbst Pilze konsumierte, deren Wirkung er genau beschrieb und bestätigte. In Folgeexpeditionen u.a. mit dem Mykologen Roger Heim wurden die verwendeten Pilze als Vertreter der Gattung *Psilocybe* identifiziert (Wasson und Wasson 1957). Aus Pilzproben dieser Expeditionen sowie aus von Heim gezüchteten Pilzen gelang Albert Hofmann die Extraktion zweier der aktiven Inhaltsstoffe: Psilocybin und Psilocin (Hofmann *et al.* 1959). Die von staatlichen Institutionen vieler Länder als Bedrohung wahrgenommene Gegenkultur der 60er Jahre, welche in Teilen den Konsum psychoaktiver Drogen wie Lysergsäure-Diethylamid (LSD) und Psilocybin befürwortete und aktiv zu diesem anregte, führte jedoch in den meisten Ländern zu einer Einstufung dieser Substanzen als nicht verkehrs- und verschreibungsfähig. Dadurch kam die Forschung an diesen Substanzen zum baldigen Erliegen und wurde erst seit der Jahrtausendwende unter strengen Auflagen wiederaufgenommen.

1.3 Biologisch aktive Naturstoffe aus Basidiomyceten

Von den vielen Naturstoffen, welche von Basidiomyceten gebildet werden, sind neben den ernährungsphysiologischen auch die biologisch aktiven Inhaltsstoffe aufgrund ihres therapeutischen Nutzens von besonderer Bedeutung. Die Bandbreite dieser Inhaltsstoffe ist äußerst groß und erstreckt sich u.a. über antimikrobielle, antivirale, antioxidative, cytostatische und cholesterinsenkende Wirkungen (De Silva *et al.* 2013). Neben hochmolekularen Inhaltsstoffen wie Polysacchariden und Proteinen sind im Rahmen dieser Arbeit besonders die niedermolekularen, dem Sekundärmetabolismus zugeordneten Stoffe von Bedeutung. Naturstoffe werden gängigerweise in Produkte des Primärmetabolismus und des Sekundärmetabolismus eingeteilt. Alle Produkte des Primärmetabolismus sind für das Überleben eines Organismus zwingend erforderlich. Produkte des Sekundärmetabolismus sind nicht essentiell, erhöhen aber die Überlebenschancen des Organismus innerhalb seines Ökosystems. Unter evolutionstheoretischen Gesichtspunkten ist die Synthese der Sekundärmetabolite das Ergebnis natürlicher Auslese in einem System mehrerer Organismen, welche in Nachbarschaft koexistieren (Hartmann 2008). Dabei stellen Sekundärmetabolite eine Schutz-, Schad- oder Kommunikationsfunktion dar (O'Brien und Wright 2011). In vielen Fällen ist die Grenzziehung zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus problematisch, weswegen auch eine Unterteilung in *basic integrated*, *supporting* und *speculative metabolism* (Grundlegender, Unterstützender und Spekulativer Metabolismus) vorgeschlagen wurde (Firn

und Jones 2009).

Für den Menschen sind Sekundärmetabolite als Quelle pharmazeutisch relevanter Stoffe wie z.B. Antibiotika, Zytostatika und cholesterinsenkender Mittel, aber auch vieler weiterer Anwendungen von Bedeutung (Vaishnav und Demain 2011). Beispielsweise ist auch in der Landwirtschaft der Einsatz von Sekundärmetaboliten abgeleiteten (partial)-synthetischen Derivaten z.B. in Form von Herbiziden weit verbreitet (Saxena und Pandey 2001, Dayan *et al.* 2009).

Sekundärmetabolite lassen sich auf Grundlage ihres biosynthetischen Ursprunges und ihrer chemischen Struktur in mehrere Gruppen unterteilen. Die bekanntesten und größten Gruppen sind die der Terpene, der Polyketide, der nichtribosomalen Peptide, der ribosomal synthetisierten und posttranslational modifizierten Peptide und die der Alkaloide. Die Gruppe der Alkaloide ist dabei eher historisch gewachsen. Abgesehen davon, dass Alkaloide von Aminosäuren abgeleitet sind, liegt weder ein einheitlicher biosynthetischer Ursprung, noch ein einheitliches chemisches Strukturmerkmal vor.

Beispiele für wichtige Sekundärmetabolite aus Basidiomyceten sind das Fungizid Strobilurin A aus *Strobilurus* spp., das antibakterielle Pleuromutilin aus *Pleurotus* spp. und das Nematodengift Omphalotin A aus *Omphalotus olearius*. (Misieki und Hoffmeister 2007, Stadler und Hoffmeister 2015, Abb. 1).

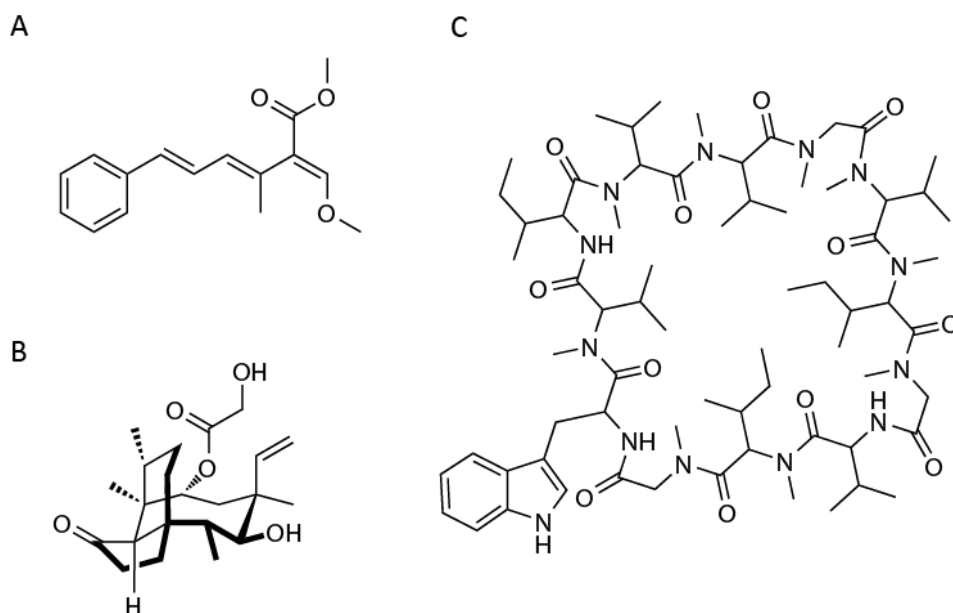


Abbildung 1: Strukturen einiger Sekundärmetabolite aus Basidiomyceten. A: Strobilurin A; B: Pleuromutilin; C: Omphalotin A

1.3.1 Biosynthese der Sekundärmetabolite

Ausgangsstoffe für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten sind in der Regel Intermediate aus dem Primärmetabolismus (Moss 2001). Terpene werden von Terpensynthasen und -cyclasen aus Isopreneinheiten, Polyketide durch Polyketidsynthasen (PKS) v.a. aus formalen Acetateinheiten, nichtribosomale Peptide v.a. aus Aminosäuren von nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) und ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptide (RiPPs) aus Aminosäuren von Ribosomen und weiteren Tailoring-Enzymen hergestellt. Viele Sekundärmetabolite haben einen gemischten biosynthetischen Ursprung. So gibt es beispielsweise PKS-NRPS Biosyntheseenzyme und NRPS, welche prenyliertes Tryptophan (Dimethylallyltryptophan) als Bausteine verwenden. So weist das Ergotamin aus *Claviceps purpurea* strukturelle Merkmale der Alkaloide, Terpene und nichtribosomalen Peptide auf (Schardl *et al.* 2006). Während und nach der Synthese der Terpene, der Polyketide und der nichtribosomalen Peptide werden diese oft noch durch weitere Enzyme verändert, bevor das Endprodukt vorliegt (Quin *et al.* 2014, Rix *et al.* 2002, Walsh *et al.* 2001). Die meisten Alkaloide leiten sich von einigen Aminosäuren, sehr häufig von Lysin, Phenylalanin und Tryptophan ab (Funayama und Cordell 2015). Die Biosynthese verschiedener Alkaloide kann durch NRPS-, PKS-, Terpensynthasen und eine Vielzahl weiterer Enzyme katalysiert werden (Xu *et al.* 2014). Die codierenden Sequenzen aller Enzyme, welche an der Biosynthese eines Stoffes beteiligt sind, liegen oft in Form eines Genclusters an einer Stelle innerhalb eines Genoms vor. Dies wurde 1990 erstmals für Pilze nachgewiesen. So liegen die Biosynthesegene der β -Lactamantibiotika in u.a. *Penicillium chrysogenum* als Gencluster vor (Smith *et al.* 1990). Seitdem wurde die Clusterung codierender Sequenzen von Biosyntheseenzymen vielfach bestätigt und hat die Suche nach solchen stark beeinflusst. Während Sekundärmetabolite ursprünglich in Kulturextrakten des jeweiligen Produzenten gefunden wurden, spürt man Sekundärmetabolite in jüngerer Vergangenheit eher über genom-basierte Methoden auf (Hautbergue *et al.* 2018). Durch Fortschritte in der DNA-Sequenzierung ist es inzwischen zeitlich und finanziell nicht mehr aufwändig, die DNA-Sequenz eines zu erforschenden Pilzes zu erhalten (Reuter *et al.* 2015). Mit bioinformatischen Methoden kann das sequenzierte Genom anschließend auf Biosynthese Gencluster hin untersucht werden. So können codierende Sequenzen für konservierte Proteinmotive, beispielsweise von Polyketidsynthasen, identifiziert werden. Über eine

vergleichende Analyse von Genomen oder vergleichende phylogenetische Genomik können auch ganze Biosynthese Gencluster gefunden werden. Anschließend können den Genclustern im Idealfall über reverse Genetik oder heterologe Produktion der Enzyme und *in-vitro* Produktbildungsassays Sekundärmetaboliten zugeordnet werden (Hautbergue *et al.* 2018). Dies ist insofern ein guter Ansatz, da Organismen, die mit dem genetischen Potential ausgestattet sind Sekundärmetabolite zu synthetisieren, dies unter Kulturbedingungen im Labor oft nicht tun. Durch fehlende Umwelteinflüsse werden die betreffenden Gencluster nicht transkribiert, man spricht von stillen („silent“) Genclustern (Brakhage 2013). Auch sind viele Organismen mit potenziell interessantem, biosynthetischem Potential schlicht nicht kultivierbar, darunter viele Ectomycorrhizabildner wie die Thelephorales.

1.4 Charakterisierung von Biosyntheseenzymen aus Basidiomyceten

Obwohl eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten aus Basidiomyceten beschrieben worden sind, ist deren Biosynthese nur in wenigen Fällen geklärt. Gründe dafür sind Schwierigkeiten bei der Kultivierung der meisten Basidiomyceten, die nur für wenige Arten erfolgreiche Zucht von Fruchtkörpern sowie fehlende Protokolle zur Transformation, genetischen Manipulation und reversen Genetik (Stadler und Hoffmeister 2015). In starkem Gegensatz dazu sind die Beispiele für Biosyntheseaufklärungen sowie die Entdeckung neuer Naturstoffe in Ascomyceten, wie beispielsweise in *Aspergillus nidulans*, dank der Fortschritte der genetischen und molekularbiologischen Methoden kaum mehr zu überblicken (Sanchez *et al.* 2012). Charakterisierte Biosyntheseenzyme aus Basidiomyceten lassen sich hingegen immer noch schnell aufzählen.

Zu den charakterisierten PKS aus Basidiomyceten gehört die Orsellinsäuresynthase ArmB aus *Armillaria mellea*. Die PKS wurde heterolog in *Escherichia coli* produziert und über Produktbildungsassays *in vitro* charakterisiert (Lackner *et al.* 2013, siehe auch Abb. 2). Auch in *Saccharomyces cerevisiae* bzw. in *Aspergillus niger* konnten Orsellinsäuresynthasen aus *Coprinopsis cinerea* und aus einem taxonomisch unbeschriebenen Vertreter aus der Familie der Stereaceae, BY1, heterolog produziert werden (Ishiuchi *et al.* 2012, Braesel *et al.* 2017). In dem als Monokaryon wachsenden und Sekundärmetabolite produzierenden Pilz *Antrodia cinnamomea* konnte ein für eine PKS codierendes Gen deletiert werden, was zu einer deutlichen Abnahme der produzierten PKS-Produkte, der Pigmentierung und der antioxidativen Wirkung des Pilzes führte (Yu *et al.* 2016). Auch diese PKS konnte später als

Orsellinsäuresynthese identifiziert werden (Yu *et al.* 2017). Neben den nichtreduzierenden Orsellinsäuresynthasen wurde die hochreduzierende PKS PPS1 aus BY1, welche ein langkettiges Polyen synthetisiert, beschrieben. Das Polyen wurde direkt in Kultur nach Integration der für die PKS codierenden genomischen Sequenz *PPS1* durch *Aspergillus niger* synthetisiert (Brandt *et al.* 2017). Das theoretische Potential von Basidiomyceten, PKS-Produkte zu synthetisieren, ist deutlich höher als die hier angeführten Beispiele vermuten lassen. So konnten in den Genomen von 35 sequenzierten Basidiomyceten 114 codierende Sequenzen für PKS gefunden werden (Lackner *et al.* 2012).

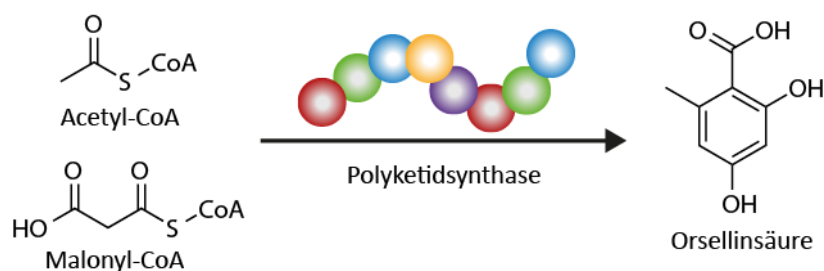


Abbildung 2: Schematische Biosynthese von Orsellinsäure. Acetyl- und Malonyl-coenzym A-Einheiten werden durch eine multimodular aufgebaute Polyketidsynthase zu Orsellinsäure verknüpft.

Auch Terpensynthasen konnten über den Umweg der heterologen Produktion und anschließender Produktanalytik charakterisiert werden. Mehrere für Terpensynthasen codierende Sequenzen aus *Coprinus cinereus* konnten heterolog in *E. coli* exprimiert werden, was zur Bildung einer Vielzahl von Sesquiterpenen, u.a. Cubebol, führte (Agger *et al.* 2009, Lopez-Gallego *et al.* 2010, siehe auch Abb. 3). Über die nun verfügbaren beispielhaften codierenden Sequenzen für Terpensynthasen aus einem Basidiomyceten konnten elf putative, für Terpensynthasen codierende Gene in *Omphalotus olearius*, einem Produzenten einer großen Vielfalt von Terpenen, gefunden werden (Wawrzyn *et al.* 2012). Auch die Protoilludensynthase, welche an der Melleolidbiosynthese in *Armillaria gallica* beteiligt ist, konnte über heterologe Expression des codierenden Gens in *E. coli* charakterisiert werden (Engels *et al.* 2011). Der für die Biosynthese des antibiotisch wirksamen Diterpens Pleuromutilin aus *Clitopilus passeckerianus* verantwortliche Gencluster konnte komplett in *Aspergillus oryzae* rekonstruiert werden, wodurch auch eine deutliche Steigerung der Pleuromutilinproduktion im Vergleich zum Ursprungsorganismus erreicht werden konnte (Bailey *et al.* 2016).

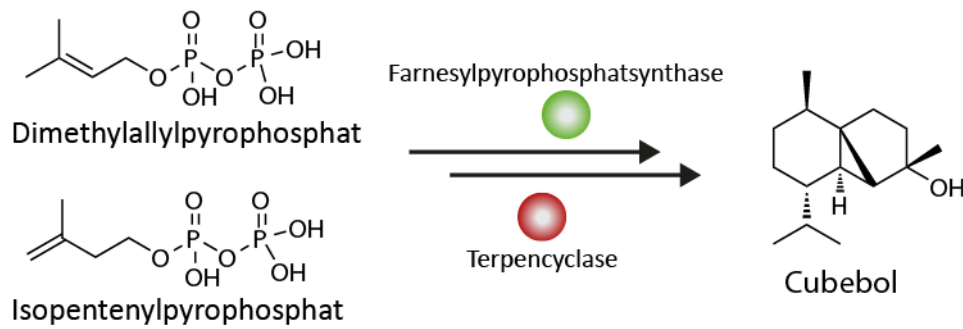


Abbildung 3: Schematische Biosynthese des Cubebols. Dimethylallylpyrophosphat und Isopentenylpyrophosphat werden zunächst von einer Farnesylpyrophosphat synthase zu Farnesylpyrophosphat verknüpft. Dieses wird von einer Terpenyclase zu Cubebol umgesetzt. (Vgl. Lopez-Galego 2010)

Dank einer saprotrophischen Phase in der *Ustilago maydis* hefeähnlich wächst, ist dessen Kultivierung und genetische Manipulation vergleichsweise einfach. Dadurch konnten Knock-Out-Mutanten erstellt werden, über die eine an der Biosynthese des Siderophors Ferrichrome A beteiligte NRPS charakterisiert werden konnte (Winterberg *et al.* 2010, siehe auch Abb. 4). Über heterologe Produktion in *Aspergillus niger* konnte eine Siderophorsynthetase aus *Ceriporiopsis subvermispora* hergestellt und *in vitro* charakterisiert werden. Über sie wurde ein neuartiges Siderophor, Basidioferrin, gefunden (Brandenburger *et al.* 2017).

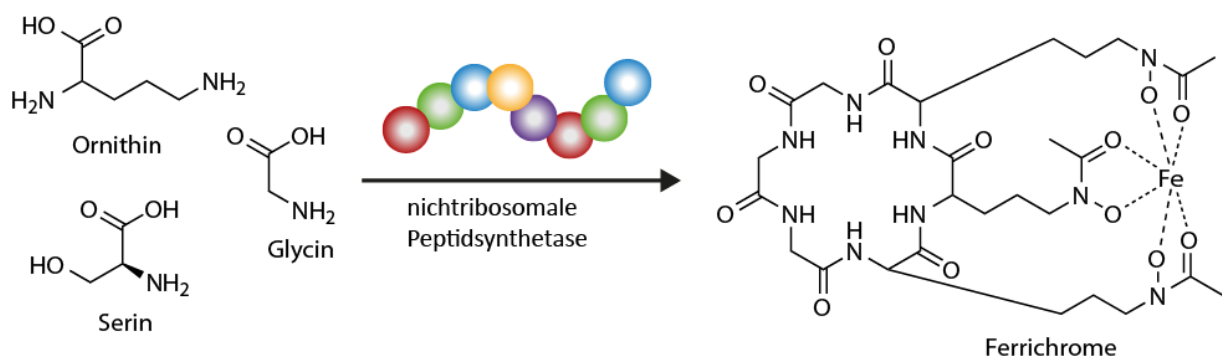


Abbildung 4: Schematische Biosynthese des Ferrichroms. Proteinogene und nichtproteinogene Aminosäuren sowie weitere Moleküle werden durch eine multimodular aufgebaute nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) verknüpft (Vgl. Winterberg 2010).

Teile der codierenden Sequenzen von PKS, NRPS und Terpensynthasen sind hochkonserviert. Daher ist das Auffinden vergleichbarer Sequenzen und etwaigen Genclustern bei vorliegendem Genom recht einfach. Die Biosynthese von Alkaloiden beruht hingegen auf

verschiedenartigsten Biosyntheseenzymen, was ein Auffinden codierender Sequenzen und Biosyntheseclustern schwierig gestaltet. Daher gibt es für Basidiomyceten nur äußerst wenige charakterisierte Alkaloidbiosyntheseenzyme. Die Biosynthese des Indolalkaloids Psilocybin aus *Psilocybe cubensis* wurde jüngst über heterologe Produktion der Biosyntheseenzyme in *Aspergillus niger* und *E. coli* aufgeklärt (Fricke *et al.* 2017). In dem bereits erwähnten *U. maydis* konnte über reverse Genetik gezeigt werden, dass eine einzelne Tryptophandeaminase verantwortlich für die Produktion mehrerer tryptophanabgeleiteter Pigmente, u.a. des Pityriacitrins, ist (Zuther *et al.* 2008, siehe auch Abb. 5). Über ein antikörpergeleitetes Screening einer cDNA-Bibliothek konnte eine an der Betalainbiosynthese beteiligte DOPA-Dioxygenase aus *Amanita muscaria* erfolgreich charakterisiert werden (Hinz *et al.* 1997). Auch für die Biosynthese des Muscarins gibt es über Fütterungsversuche Hinweise auf einen biosynthetischen Ursprung, beruhend auf Pyruvat und Glutamat (Nitta *et al.* 1977).

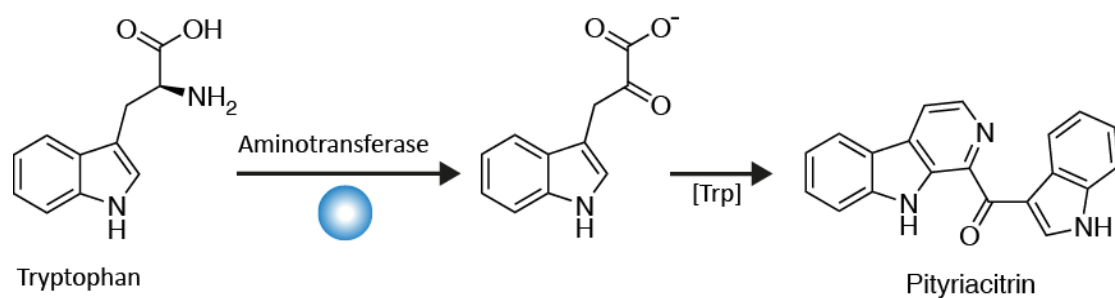


Abbildung 5: Schematische Biosynthese des Pityriacitrins. Ein einzelnes Enzym, eine Tryptophanaminotransferase setzt Tryptophan zu Indolpyruvat um, welches anschließend spontan mit einem weiteren Tryptophan reagiert und Pityriacitrin bildet (Vgl. Zuther 2008)

Auf der Suche nach dem biosynthetischen Ursprung der Cyclopeptide α -Amanitin und Phalloidin, zweier sehr starker Zellgifte aus Vertretern der Gattungen *Amanita*, *Galerina*, *Lepiota* und *Conocybe*, wurde zunächst von einer Biosynthese über NRPS ausgegangen, da alle bis dahin aufgeklärten Biosynthesen pilzlicher Cyclopeptide von NRPS durchgeführt wurden. Nach langwieriger Sequenzierung und Suche fand sich jedoch kein NRPS-codierendes Gen in *Amanita bisporigera*, jedoch genomische Sequenzen, welche für die Aminosäureabfolge der beiden Toxine codieren (Hallen *et al.* 2007). Diese codieren zunächst für ein längeres Proprotein, welches durch eine prolinspezifische Peptidase bis auf die letztendlich im Toxin vorhandenen Aminosäuren gekürzt und anschließend cyclisiert wird (Luo *et al.* 2014, siehe auch Abb. 6). Somit gehören Amanitin und Phalloidin zu den RiPPs.

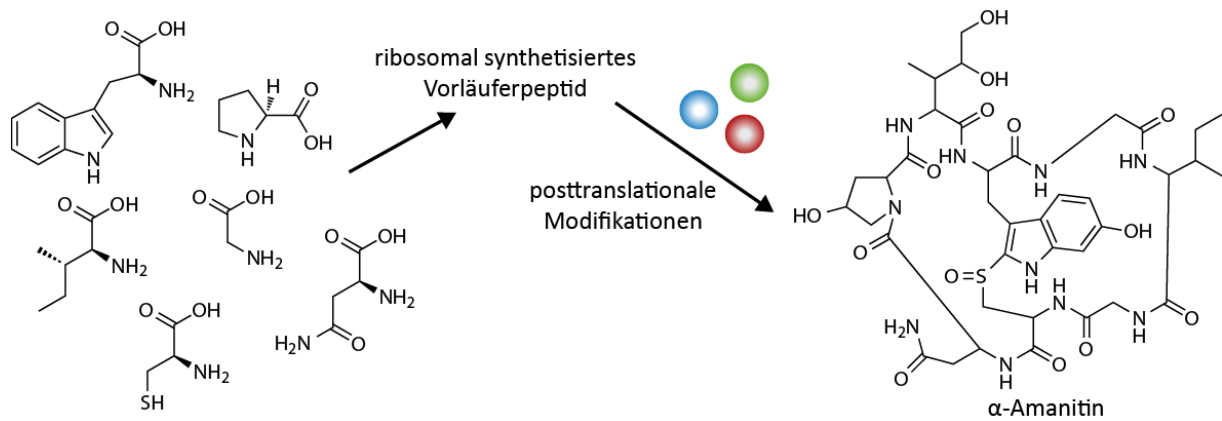


Abbildung 6: Schematische Biosynthese des α -Amanitins. Proteinogene Aminosäuren werden ribosomal zu einem Vorläuferpeptid verknüpft, welches anschließend von verschiedenen Enzymen prozessiert und cyclisiert wird (Vgl. Hallen 2007, Luo 2014).

Die hier angeführten Beispiele illustrieren die geringe Anzahl von aufgeklärten Biosynthesen von Sekundärmetaboliten aus Basidiomyceten. Durch die erwähnten Schwierigkeiten bei der Aufklärung der Biosynthese wird in den meisten Fällen das Ausweichen auf heterologe Expressionssysteme erforderlich. Die Vielzahl sequenzierter Basidiomycetengenome vereinfachen, im Falle konservierter Sequenzen für die Multidomänenenzyme PKS und NRPS, der Terpensynthasen oder der Sequenzen für RiPPs sowie deren häufige Clusterung, das Auffinden von Biosyntheseenzymen. Die besondere Schwierigkeit ist daher das Auffinden von Biosyntheseenzymen aus Basidiomyceten, deren codierende Sequenzen nicht zu denen der Multidomänenenzyme gehören und auch nicht Teil eines Biosynthese Genclusters sind.

1.4.1 Das Auffinden schwer identifizierbarer Biosyntheseenzyme

Trotz der Schwierigkeiten, die sich gerade für Basidiomyceten bei der Charakterisierung von Biosyntheseenzymen ergeben, ist auch hier die Aufklärung der Biosynthesewege von besonderem Interesse. Viele Sekundärmetabolite aus Basidiomyceten weisen einzigartige Struktur- und Wirkungseigenschaften auf und erweitern so die Vielfalt der Sekundärmetabolite insgesamt. Pilzliche Sekundärmetabolite sind, wie auch solche aus Pflanzen oder Bakterien, oft nicht durch eine einfache, chemische Synthese zugänglich. Auch kann die Produktion im Ursprungsorganismus eventuell den benötigten Bedarf einer Substanz nicht decken. Die Kenntnis der Biosynthesewege eröffnet eine alternative Route, um komplexe Stoffe heterolog in großen Fermentationsansätzen produzieren zu lassen. Auch können Biosynthesewege manipuliert und so die Eigenschaften der Endprodukte verändert

werden. Neben der Aufklärung der Biosynthesewege bekannter Sekundärmetabolite sind auch die der unbekannten Sekundärmetabolite von Bedeutung. Inzwischen sind 335 komplette Genome von Basidiomyceten beim Joint Genome Institute hinterlegt (Stand April 2018). Über die Vielzahl von verfügbaren Genomsequenzen sind so inzwischen immer mehr vermutete Biosynthese Gencluster gefunden worden, ohne dass das Endprodukt der Biosynthese bekannt ist. Über die Aufklärung der Biosynthese der unbekannten Stoffe können potenziell pharmazeutisch interessante Substanzen entdeckt werden.

Um die Biosynthese eines Stoffes vollständig aufzuklären, müssen die codierenden Gensequenzen der Biosyntheseenzyme, die Biosyntheseenzyme selbst, deren Substrate und das Endprodukt der enzymatischen Reaktionen bekannt sein. Als Ausgangspunkt für biosynthetische Arbeiten sollte mindestens einer der oben genannten Punkte bereits bekannt sein. Das Ziel ist die Aufklärung der genetischen und enzymatischen Grundlagen der Biosynthese. Die Motivation für die vorliegende Arbeit war, dabei ausdrücklich Naturstoffe einzubeziehen, deren Biosynthese nicht oder nur teilweise auf PKS, NRPS oder Terpensynthasen beruht. Dies sind 1) Melleolide, deren biosynthetische Ursprünge zwar auf einer PKS und einer Terpensynthase beruhen, an deren Biosynthese aber auch Halogenasen beteiligt sind, die aber nicht im entsprechenden Gencluster codiert sind 2) Psilocybin, von dem zu Beginn dieser Arbeit bis auf einer von der Aminosäure Tryptophan ausgehenden Biosynthese weitere Schritte unbekannt waren und 3) Agaritin, welches ebenfalls einen Aminosäureursprung besitzt, dessen Biosynthese aber bisher nicht aufgeklärt wurde. Diese Substanzen sowie deren Produzenten werden nachfolgend präsentiert.

Armillaria mellea ist als bedeutender Zersetzer von Lignin und somit als Weißfäuleerreger ein wichtiger Vertreter saprotropher Basidiomyceten (Shaw und Kile 1991). Gleichzeitig ist *Armillaria mellea* ein bedeutender Pflanzenparasit, welcher Pflanzenwurzeln besiedelt, abtötet und anschließend als saprober Pilz den nun toten Baum zersetzt (Guillaumin *et al.* 1993, Baumgartner und Hoffmeister 2011). Wahrscheinlich maßgeblich an seiner Virulenz beteiligt sind die Melleolide, eine Gruppe von Sekundärmetaboliten, welche in Pilzen der Gattung *Armillaria* vorkommen (siehe Abb. 7). Melleolide zeigen antibakterielle, antifungale, phytotoxische und cytostatische Wirkung und sind daher auch von pharmazeutischem Interesse (Donnelly *et al.* 1982; Peipp und Sonnenbichler 1992, Misiek *et al.* 2009).

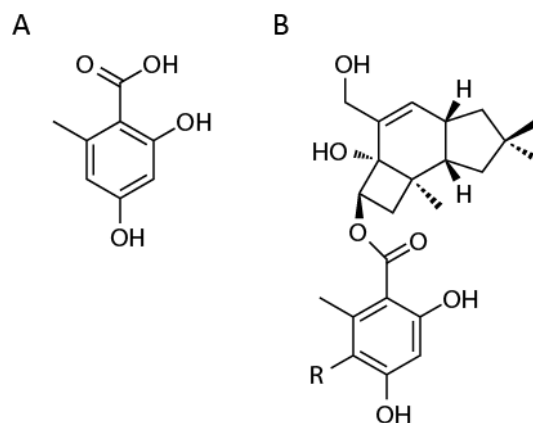


Abbildung 7: A: Orsellinsäure, B: R=H: Melleolid F; R=Cl: 6-Chloromelleolid F

Strukturell bestehen die mehr als 50 bisher beschriebenen Melleolide aus einem Sesquiterpen und einem Orsellinsäureteil (siehe Abb. 7). Die Vielzahl der beschriebenen Melleolide ist auf ein diverses Hydroxylierungs-, Methylierungs- und Chlorierungsmuster zurückzuführen. Auch die Lage der Doppelbindung im Sesquiterpenteil variiert, was die antifungale Wirkung der Melleolide erheblich beeinflusst (Bohnert *et al.* 2014). Für die Biosyntheseenzyme codiert weitestgehend ein Gencluster, welcher neben einer Terpensynthase und einer PKS auch eine Vielzahl von putativen, an der Biosynthese beteiligten Enzyme codiert (Lackner *et al.* 2013, Engels *et al.* 2011, Engels 2013). Das Vorkommen mehrerer chlorierter Melleolide weist zusätzlich auf an der Biosynthese beteiligte Halogenasen hin (Abb. 7 B). Mit Hilfe von degenerierten Primern auf Basis flavinabhängiger Halogenasen konnten zwei Gensequenzen gefunden werden, welche putativ für flavinabhängige Halogenasen codieren (Misiek 2009). Diese zwei Halogenasen konnten jedoch nicht biochemisch charakterisiert werden. Die Sequenzierung und Veröffentlichung des kompletten Genoms von *Armillaria mellea* eröffnete weitere Möglichkeiten, codierende Sequenzen für Biosyntheseenzyme zu finden (Collins *et al.* 2013). In dem Fall der Melleolide waren somit Teile der Biosynthese bereits aufgeklärt sowie ein Biosynthese Gencluster identifiziert worden. Zusätzlich waren die Strukturen vieler Melleolide bereits aufgeklärt, was Rückschlüsse auf die Biosynthese erlaubte. Mit dem Wissen, dass strukturell ähnlich aufgebaute Sekundärmetabolite mit aromatischem Ring meist von flavinabhängigen Halogenasen chloriert werden, konnte speziell nach konservierten Bereichen in deren codierenden Sequenzen gesucht werden.

Wie eingangs beschrieben, enthalten Pilze verschiedener Gattungen, jedoch hauptsächlich solche der Gattung *Psilocybe*, das Alkaloid Psilocybin. Während Wirkung und mögliche Anwendung in den sechziger Jahren intensiv beforscht wurden, wird die Forschung seit der Einstufung des Psilocybins als nicht verkehrs- und verschreibungsfähige Substanz in vielen Ländern erschwert. Seit der Jahrtausendwende wird Psilocybin jedoch wieder intensiver beforscht, beispielsweise zur Behandlung therapieresistenter Depressionen, von Depressionen und Angstzuständen in der Palliativmedizin, von Suchterkrankungen wie Alkoholismus und Nikotinismus, von Zwangsstörungen und bei Cluster-Kopfschmerzen (Johnson und Griffiths 2017). Hierbei sollte darauf hingewiesen werden, dass viele dieser Studien aufgrund gesetzlicher Beschränkungen noch immer mit sehr wenigen Probanden durchgeführt werden und zum Teil auf Auswertungen von Selbsterfahrungsberichten und/oder auf der Analytik von Metadaten beruhen.

Nach der Entdeckung des Psilocins als aktivem Wirkstoff psychoaktiver Pilze durch Hofmann (Hofmann *et al.* 1959) konnten weitere aktive Indolderivate wie Baeocystin und Norbaeocystin aus psychoaktiven Pilzen isoliert werden (Leung und Paul 1968, Gartz 1991). In Extrakten des Psilocybinproduzenten *Inocybe aeruginascens* konnte zusätzlich ein weiteres Indolalkaloid, das Aeruginascin (Abb. 8: P) nachgewiesen werden (Jensen *et al.* 2006).

Als biosynthetischer Ursprung des Psilocybins konnte über Fütterungsexperimente Tryptophan identifiziert werden (Brack *et al.* 1961). Weitere Arbeiten durch Fütterung vermuteter biosynthetischer Zwischenstufen ergab einen ersten vollständigen Vorschlag zur Biosynthese des Psilocybins aus Tryptophan über Tryptamin, Dimethyltryptophan (DMT) und Psilocin (Agurell und Nilsson 1968, siehe Abb. 8). Schon in jener Arbeit wurde darauf hingewiesen, dass dies wahrscheinlich nicht die alleinige Biosyntheseroute sei, da beispielsweise Norbaeocystin und Baeocystin keine Zwischenprodukte dieses Biosyntheseweges seien. Daher wurde auch von einem biosynthetischen Raster ausgegangen, in dem verschiedene Biosynthesewege zum gleichen Endprodukt führen (Laatsch 1998). Dass die Biosyntheseenzyme in *P. cubensis* relativ unspezifisch sind, konnte über Fütterung von Diethyltryptamin und dessen Umsetzung zu 4-Hydroxydiethyltryptamin und 4-Phosphoxydiethyltryptamin gezeigt werden (Gartz 1989). Theoretisch könnte ein möglicher Biosyntheseweg auch zunächst über die Methylierung des Tryptophans zu zunächst Dimethyltryptophan, verlaufen. Diese Schritte könnten jedoch auch Teil der Biosynthese des Hypaphorins (*N-N-N*-Trimethyltryptophan, Abb 8, D) sein. Hypaphorin wird u.a. von dem

Ectomycorrhizabildner *Pisolithus tinctorius* gebildet, vor allem bei Kontakt mit seinem Symbiosepartner *Eucalyptus globulus* (Béguiristain und Lapeyrie 1997). Hypaphorin fungiert hier als Antagonist zu dem Auxin Indol-3-Acetat und hat so maßgeblichen Einfluss auf das Wachstum und die Morphologie der Wurzeln von *E. globulus* (Ditengou *et al.* 2003)

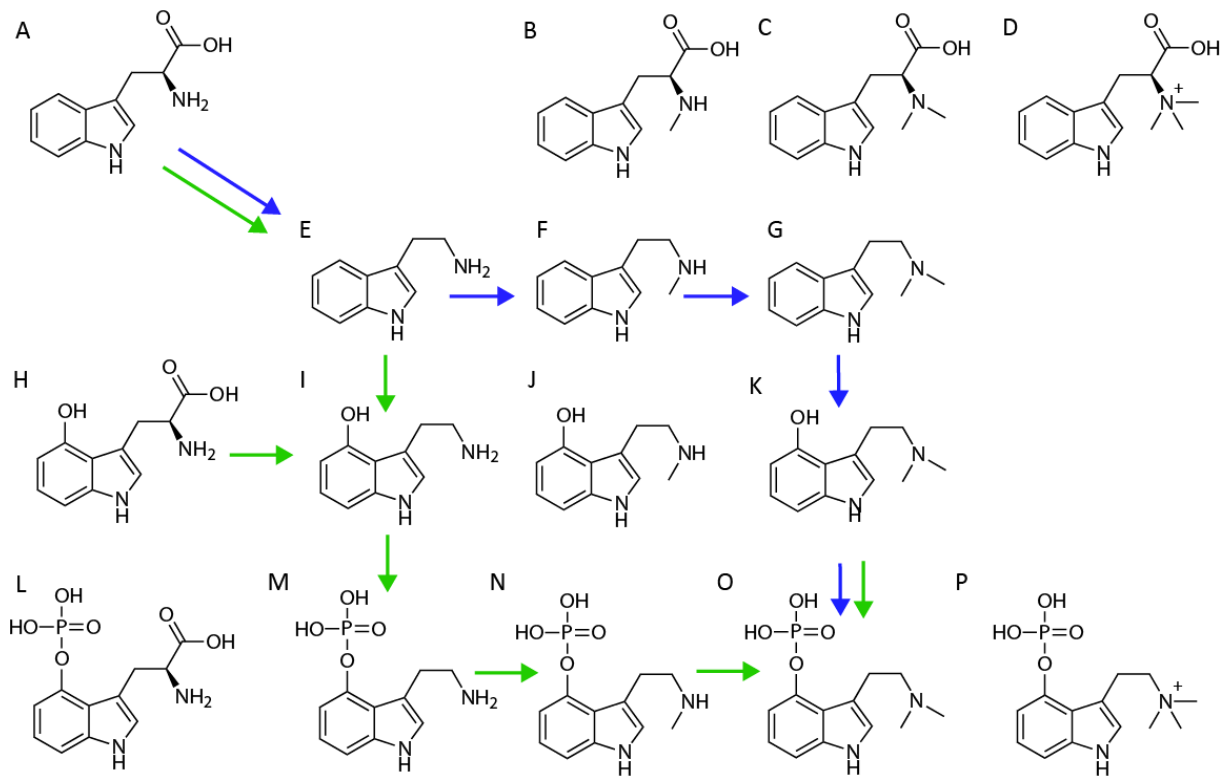


Abbildung 8: Alle möglichen Zwischenstufen der Biosynthese des Psilocybins sowie in Pilzen nachgewiesene Naturstoffe. Bereits aus psilocybinhaltigen Pilzen bekannte Stoffe sind Tryptophan (A), Psilocin (K), Norbaeocystin (M), Baecystin (N), Psilocybin (O) und Aeruginascin (P). Über blaue Pfeile ist die von Agurell und Nilsson 1968 nach Fütterungsexperimenten vorgeschlagene Biosynthese eingezeichnet. Grüne Pfeile kennzeichnen die von Fricke *et al.* vorgeschlagene Biosynthese. Zusätzlich ist der Umsatz von H zu I und K zu O eingezeichnet, welche ebenfalls von charakterisierten Biosyntheseenzymen katalysiert wird (Fricke *et al.* 2017).

Eine Charakterisierung aller beteiligten Biosyntheseenzyme durch Klonierung von cDNA aus *Psilocybe tampanensis* und heterologer Produktion in *S. cerevisiae* verlief leider für keines der Enzyme erfolgreich (Jensen 1999). Dies entsprach dem Kenntnisstand über die Biosynthese des Psilocybins zu Beginn der vorliegenden Arbeit. Parallel zu dieser, auf proteinbiochemischen-molekularbiologischen Methoden fußenden, Arbeit wurde im gleichen Arbeitskreis ein bioinformatisch-molekularbiologischer Ansatz zur Aufklärung der Biosynthese gestartet, über den die Biosynthese des Psilocybins in *P. cubensis* mit allen beteiligten Enzymen erfolgreich aufgeklärt werden konnte (Fricke *et al.* 2017, Abb. 8, Abb. 9).

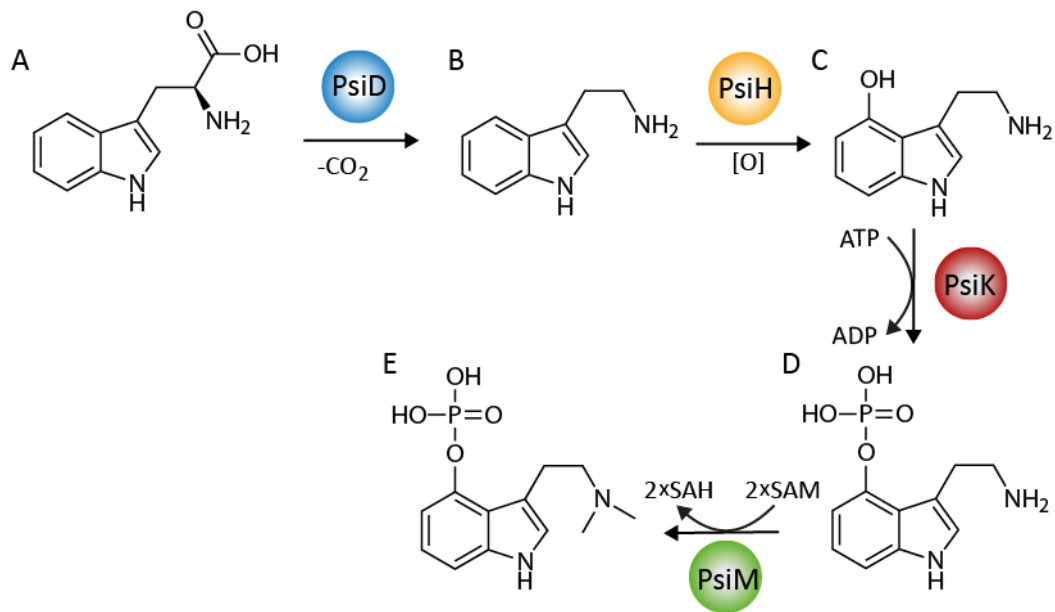


Abbildung 9: Biosynthese des Psilocybins ausgehend von Tryptophan (Vgl. Fricke 2017)

Ein gemeinsames Merkmal psilocybinhaltiger Pilze ist es, sich bei Verletzung blau zu verfärben. Dies spiegelt sich auch in einzelnen Artnamen wie beispielsweise *Psilocybe cyanescens*, *Psilocybe azurescens* und *Panaeolus cyanescens* wieder (Cyan, κύανος, Altgriechisch: Schwarzblau; Azur, azzurum lat.: Blau). Schon in seiner Arbeit zur Darstellung von Psilocybin und Psilocin beschrieb Hofmann die Autooxidation von Psilocin in wässriger Lösung und die Oxidation durch Eisen(III)-chlorid zu einem blauen Oxidationsprodukt (Hofmann *et al.* 1959). Bald darauf konnte ein sauerstoffabhängiger Umsatz von Psilocin in ein blaues Produkt durch einen Enzymextrakt aus *Mytilus edulis* beobachtet werden (Blaschko und Levine 1960a, Blaschko und Levine 1960b). Auch der enzymatische Umsatz von Psilocybin zu Psilocin durch alkalische Phosphatasen konnte früh gezeigt werden (Horita und Weber 1961). Mehrere Projekte zur Isolierung und Charakterisierung des blauen Oxidationsproduktes des Psilocins scheiterten aber in den Folgejahren (Laatsch 1998). Es ist jedoch möglich, dass nicht Psilocybin, sondern der blaue Farbstoff das aus ökologischer Sicht erwünschte Endprodukt dieses Biosyntheseweges ist. Neben der Biosynthese des Psilocybins, welches vermutlich eine Speicherform darstellt, ist der weitere, enzymatische Umsatz zu dem blauen Farbstoff sowie die Charakterisierung und Evaluierung seiner ökologischen Funktion von besonderem Interesse.

Der beliebte Speisepilz *Agaricus bisporus* gehört zu den am meisten gezüchteten, gehandelten und verzehrten Pilzen weltweit (Valverde *et al.* 2015). Ein in *Agaricus bisporus* und anderen Vertretern der Agaricaceae enthaltener Sekundärmetabolit ist das Agaritin (Abb. 10, A), eine als Hydrazinderivat auffällige Verbindung (Levenberg 1964). Agaritin kann zu einer Gruppe eng verwandter Sekundärmetabolite aus der Gattung *Agaricus* gezählt werden, zu denen auch das γ -Glutamyl-4-Hydroxyanilin (Abb. 10, B) aus *Agaricus hortensis* (Jadot *et al.* 1960), welches auch in *Agaricus bisporus* zu finden ist (Gigliotti und Levenberg 1964), sowie das Xanthodermin aus *Agaricus xanthodermus* gehört (Hilbig 1985, Abb.10, C). Diesen Stoffen ist eine 4-substituierte Anilin bzw. Hydrazingrundstruktur gemein, welche zusätzlich über die Amin- bzw. Hydrazingruppe mit einem γ -Glutamylrest verknüpft ist.

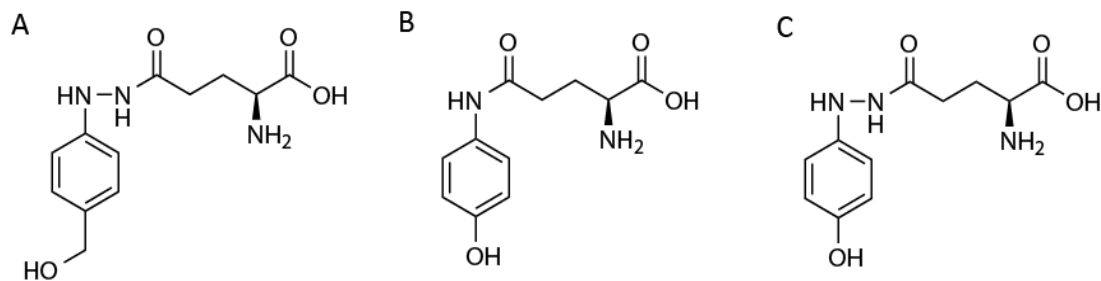


Abbildung 10: In *Agaricus bisporus* gefundene Naturstoffe Agaritin (A) und γ -Glutamyl-4-Hydroxyanillin (B) sowie der in *Agaricus xanthodermus* gefundene Naturstoff Xanthodermin (C).

Eine in *Agaricus bisporus* vorkommende Glutamylhydrolase konnte aus nativem Proteinextrakt aufgereinigt werden und katalysierte *in vitro* die Hydrolyse von Agaritin zu Glutamat und Hydroxymethylphenylhydrazin (Levenberg 1961). Für diese Glutamylhydrolase konnte auch eine Transferaseaktivität sowie ein breites Substratspektrum gezeigt werden. Neben dem Transfer des Glutamylrestes von Agaritin auf p-Hydroxyanillin konnte dieser Transfer auch von Glutamylcyclohexylamin auf Phenylhydrazin und γ -Glutamyl-4-Hydroxyanillin auf Phenylhydrazin gezeigt werden (Gigliotti und Levenberg 1964). Des weiteren gibt es Hinweise auf die enzymatische Bildung des 4-Methoxy-Phenyldiazoniumions (Abb. 11), wahrscheinlich über das Hydrazinintermediat aus Agaritin (Ross *et al.* 1982). Eine auf Agaritin, das Hydrazin- und Diazoniumderivat, zurückgehende karzinogene Wirkung war wegen der weiten Verbreitung von *Agaricus bisporus* als Nahrungsmittel lange Gegenstand wissenschaftlicher Arbeiten. Neueren Erkenntnissen nach ist der Verzehr von *Agaricus bisporus* durch Säugetiere und Menschen jedoch unbedenklich (Roupas *et al.* 2010). Dennoch ist eine genauere Charakterisierung der Glutamyltransferase/hydrolase als

Schlüsselenzym durch die Abspaltung des Glutamylrestes des Agaritins als vermutlich erstem Schritt hin zu den putativ karzinogenen Produkten interessant.

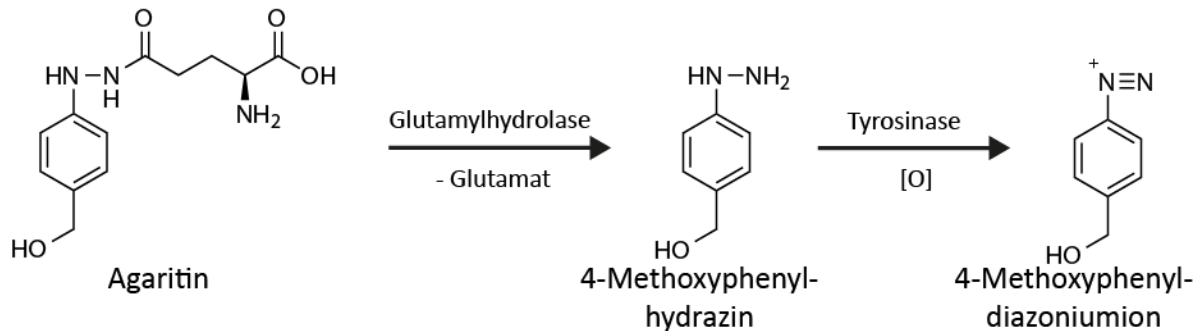


Abbildung 11: Putativer enzymatischer Umsatz von Agaritin zu dem krebserregenden 4-Methoxyphenyl-diazoniumion (Vgl. Ross 1982).

Die für die Chlorierung der Melleolide verantwortliche Halogenase, die für die Biosynthese des Psilocybins sowie die für dessen Umsatz zu dem blauen Produkt verantwortlichen Enzyme und schließlich die für den Umsatz des Agaritins verantwortlichen Enzyme haben gemein, dass sie zu den schwer identifizierbaren Biosyntheseenzymen gezählt werden können. Sie gehören nicht zu den Multidomänenenzymen, können daher nicht über konservierte Motive bioinformatisch identifiziert werden. Auch gehören sie nicht, wie beispielsweise Terpencyclasen, zu einer gut untersuchten Enzymklasse. Des weiteren war zu Beginn der vorliegenden Arbeit nicht für alle putativen Biosyntheseenzyme klar, ob deren codierende Sequenzen in Form eines Genclusters vorliegen. Zusätzliche Schwierigkeiten ergeben sich durch die Kultivierung der Basidiomyceten und nur sehr eingeschränkte Möglichkeiten, genetische Manipulationen an diesen vorzunehmen.

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde an den Melleoliden aus *Armillaria mellea*, dem Psilocybin aus *Psilocybe cubensis* und dem Agaritin aus *Agaricus bisporus* geforscht. Dabei war die Untersuchung der Biosynthese zur Bildung und weiteren Umsetzung dieser Stoffe von besonderem Interesse. Da alle untersuchten Basidiomyceten zur Ordnung Agaricales gehören, wurden zudem putative Gemeinsamkeiten in der ökologischen Bedeutung der einzelnen Naturstoffe beforscht.

2.1 Untersuchung der Melleolid-Biosynthese in *Armillaria mellea*

Ein großer Teil der Melleolidbiosynthese ist bereits beforscht worden und einzelne Biosyntheseenzyme sind charakterisiert. Auch konnte in dem Genom von *Armillaria mellea* ein Melleolid-Biosynthese Gencluster gefunden werden. Da dort jedoch keine codierende Sequenz für eine Halogenase vorhanden ist, es jedoch chlorierte Melleolide gibt, war ein Ziel dieser Arbeit die Identifizierung und Charakterisierung der Melleolid-Halogenasen.

2.2 Untersuchung der Psilocybin-Biosynthese in *Psilocybe cubensis*

Neben dem Tryptophanursprung des Psilocybins sowie einer vermuteten Biosynthese, welche auf Fütterungsexperimenten beruhte, waren zu Beginn dieser Arbeit noch keine weiteren Arbeiten zur Biosynthese des Psilocybins vorhanden. Daher war Ziel dieses Projektes die Aufklärung oder Bestätigung des Biosyntheseweges sowie die Charakterisierung der an der Biosynthese beteiligten Enzyme. Im Laufe der Arbeit wurden des weiteren die enzymatischen Folgereaktionen des Psilocybins zu einem blauen Farbstoff untersucht.

2.3 Untersuchung der Glutamylyltransferase aus *Agaricus bisporus*

Die enzymatische Reaktion des Agaritins zu einem Hydrazinderivat konnte bisher nur mit einer nativen Glutamylyltransferase/hydrolase gezeigt werden. Daher sollte nun auch die für dieses Enzym codierende Sequenz untersucht und die enzymatische Reaktion mit heterolog produziertem Enzym nachgestellt werden.

3 Publikationen

3.1 Publikation 1, Wick et al. (2016), *Applied and Environmental Microbiology*

A Fivefold Parallelized Biosynthetic Process Secures Chlorination of *Armillaria mellea* (Honey Mushroom) Toxins.

Jonas Wick, Daniel Heine, Gerald Lackner, Mathias Misiek, James Tauber, Hans Jagusch, Christian Hertweck, Dirk Hoffmeister.

Appl Environ Microbiol (2016)

Armillaria mellea, der Honiggelbe Hallimasch, ist ein Produzent der antibiotisch wirksamen und phytotoxischen Melleolide. Melleolide bilden eine der größten Gruppen fungaler Naturstoffe aufgrund zahlreicher unterschiedlicher Funktionalisierungen. In dem für die Melleolidbiosynthese codierenden Gencluster findet sich keine codierende Sequenz für eine Halogenase, obwohl eine Vielzahl chlorierter Melleolide beschrieben wurden. In dem Genom von *Armillaria mellea* wurden fünf verschiedene, für die flavinabhängigen Halogenasen ArmH1-ArmH5 codierenden Gensequenzen gefunden. Die Halogenasen wurden heterolog in *E. coli* produziert sowie charakterisiert und zeigten alle einen Umsatz von freiem Substrat in ein chloriertes Endprodukt. Eine phylogenetische Untersuchung flavinabhängiger Halogenasen ergab, dass fungale Halogenasen eine monophyletische Klade bilden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine frühere Einteilung von Halogenasen in solche, welche trägerproteingebundenes Substrat und solche, welche freies Substrat umsetzen nicht für ArmH1-ArmH5 zutrifft.

Angaben zum Eigenanteil von J. Wick [30 %]

Transformation von *E. coli* mit pMM13, pMM21, pHJ28, pHJ14, pHJ05, und pMM14, heterologe Herstellung von ArmH1-ArmH5 sowie der für den Assay benötigten Flavinreduktase, Aufreinigung und Analyse, *in-vitro* Produktbildungsassay, HPLC-Analytik, Mitarbeit bei der Erstellung des Manuskriptes.

Jena den

Prof. Dr. Dirk Hoffmeister

A Fivefold Parallelized Biosynthetic Process Secures Chlorination of *Armillaria mellea* (Honey Mushroom) Toxins

Jonas Wick,^a Daniel Heine,^b Gerald Lackner,^c Mathias Misiek,^a James Tauber,^a Hans Jagusch,^a Christian Hertweck,^b Dirk Hoffmeister^a

Department of Pharmaceutical Microbiology, Hans Knöll Institute, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany^a; Department of Biomolecular Chemistry, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology-Hans Knöll Institute, Jena, Germany^b; Institute of Microbiology, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich, Switzerland^c

The basidiomycetous tree pathogen *Armillaria mellea* (honey mushroom) produces a large variety of structurally related antibiotically active and phytotoxic natural products, referred to as the melleolides. During their biosynthesis, some members of the melleolide family of compounds undergo monochlorination of the aromatic moiety, whose biochemical and genetic basis was not known previously. This first study on basidiomycete halogenases presents the biochemical *in vitro* characterization of five flavin-dependent *A. mellea* enzymes (ArmH1 to ArmH5) that were heterologously produced in *Escherichia coli*. We demonstrate that all five enzymes transfer a single chlorine atom to the melleolide backbone. A 5-fold, secured biosynthetic step during natural product assembly is unprecedented. Typically, flavin-dependent halogenases are categorized into enzymes acting on free compounds as opposed to those requiring a carrier-protein-bound acceptor substrate. The enzymes characterized in this study clearly turned over free substrates. Phylogenetic clades of halogenases suggest that all fungal enzymes share an ancestor and reflect a clear divergence between ascomycetes and basidiomycetes.

The basidiomycete genus *Armillaria* includes numerous species that are known as notorious butt and root rot agents (1). They are globally distributed as hardwood or conifer pathogens (2) in managed and unmanaged forests and also damage fruit trees and grapes. Therefore, the genus is best known for its economic burden. Despite being serious plant pathogens, *Armillaria* species also play a positive environmental role, as they depolymerize lignocellulose and therefore help maintain the carbon flux in ecosystems.

A remarkable physiological feature of *Armillaria* species is the capacity to produce melleolide natural products (Fig. 1) (3–7). These secondary metabolites feature a unique molecular scaffold composed of an orsellinic acid (2,4-dihydroxy-6-methylbenzoic acid) (Fig. 1) moiety esterified to a tricyclic sesquiterpene (protoilludane) alcohol. The melleolides are intriguing, as they show two distinct structure-activity relationships for their cytotoxic and antifungal bioactivities (8). Phytotoxic activities have also been established (9, 10). Further, the melleolides represent one of the largest fungal natural product families with more than 60 structural variants. This degree of variation stems from a permutational organization of the biosynthesis that combines hydroxylation at various positions of the sesquiterpene, oxidation of the primary alcohol at C-1 to an aldehyde or carboxy group, shift or reduction of the cyclohexene double bond, and methyl ether formation at O-5'. Regioselective chlorination at C-6' also contributes to the structural diversity, reflected by about 25 described chlorinated melleolides.

None of the enzymes that modify the melleolide scaffold has been discovered to date. However, the protoilludene synthase Pro1 (11) and the orsellinic acid synthase ArmB (12) that elaborate the melleolide core structure have been characterized and described. These enzymes and those hypothesized to catalyze the above-mentioned modifications are encoded in a contiguous single-copy cluster of genes (Fig. 2), as is evident from the published genomic sequence of *Armillaria mellea* (13). Intriguingly, the gene cluster does not include any halogenase gene. Covalent attachment of a halogen atom represents a frequently found modifica-

tion of microbial natural products. Currently, more than 4,000 mostly chlorinated or brominated compounds of biological origin are known (14). They include potent bioactive compounds, such as the HSP90 inhibitor radicicol from *Chaetomium chiversii* and *Metacordyceps* (*Pochonia*) *chlamydosporia* (15, 16) or the cytotoxic endiayne C-1027 (17) of *Streptomyces globisporus*. Even some clinically used antibiotics and anticancer drugs show halogenation, e.g., the antifungal agent griseofulvin of *Penicillium aethiopicum* (18) and the anticancer drug calicheamicin of *Micromonospora echinospora* subsp. *calichensis* (19), which carry chlorine and iodine atoms, respectively. The gene clusters for the above-mentioned biosyntheses all encode one flavin-dependent halogenase.

Using melleolide F as a model representative of this class of compounds, we provide evidence that five actively transcribed genes outside the *A. mellea* melleolide biosynthesis gene cluster code for functional flavin-dependent halogenases (ArmH1 to ArmH5) that catalyze the transfer of a single chlorine atom to melleolides. This first study on basidiomycete halogenases, therefore, reveals an unprecedented case of a biosynthetic process that is secured by a 5-fold redundancy. *In vitro* characterization using heterologously produced enzymes suggests that these halogenases act on free substrates, i.e., they do not depend on carrier-protein-tethered acceptor molecules.

Received 30 September 2015 Accepted 2 December 2015

Accepted manuscript posted online 11 December 2015

Citation Wick J, Heine D, Lackner G, Misiek M, Tauber J, Jagusch H, Hertweck C, Hoffmeister D. 2016. A fivefold parallelized biosynthetic process secures chlorination of *Armillaria mellea* (honey mushroom) toxins. *Appl Environ Microbiol* 82:1196–1204. doi:10.1128/AEM.03168-15.

Editor: D. Cullen, USDA Forest Products Laboratory

Address correspondence to Dirk Hoffmeister, dirk.hoffmeister@leibniz-hkl.de.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03168-15>.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

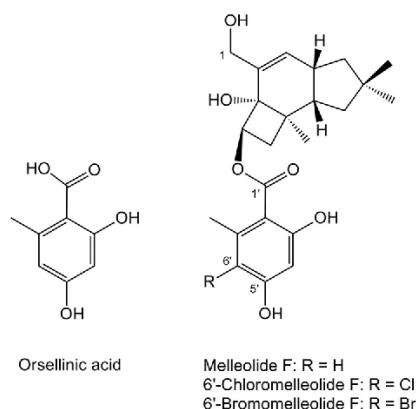


FIG 1 Chemical structures of orsellinic acid and melleolide F and its halogenated derivatives.

MATERIALS AND METHODS

General methods, strains, and chemicals. Chemicals, organic solvents, media, reagents, and antibiotics were purchased from Becton-Dickinson, Roth, Sigma-Aldrich, and VWR, except melleolide F, which was enriched to about 90% purity from *A. mellea* mycelium, following a published procedure (20). Molecular biology methods followed the protocols supplied with the kits, enzymes, and reagents (Fermentas, New England Biolabs, Promega, Thermo, and Zymo Research). *A. mellea* DSM3731 was routinely maintained on malt extract-peptone (MEP) agar, pH 5.6, at 24°C. Liquid cultures were grown in glucose minimal medium (GMM) (21) at 24°C and shaken at 180 rpm for 12 to 14 days in the dark. Stationary cultures were grown in penicillin flasks in 1 liter MEP broth. For bromine and iodine feeding, KCl was replaced by KBr and KI, respectively, in the GMM.

In silico sequence analysis. The published genomic-DNA sequence of *A. mellea* (13) was searched using the protein sequences of the protoiludene cyclase Pro1 (GenBank accession no. AGR34199), the polyketide synthase (PKS) ArmB (GenBank accession no. AFL91703), and the halogenase ArmH1 (GenBank accession no. AEM76785) as queries (11, 12, 22) and using the BLASTP function integrated in the Joint Genome Institute's Genome Portal (23).

Cloning of *armH1* to *armH5* cDNA. Total RNA was extracted from *A. mellea* DSM3731 mycelium under melleolide-producing conditions. Mycelia were filtered under vacuum, washed with distilled H₂O (dH₂O), and ground by mortar and pestle under liquid nitrogen before total RNA extraction using the SV Total RNA Isolation System (Promega) by following the manufacturer's spin protocol. First-strand synthesis of *armH1* and

armH2 was accomplished with the oligonucleotide primer cHalR2 (Table 1) and ImProm-II reverse transcriptase, using previously described parameters (24). Using 1 μ l of the first-strand synthesis reaction mixture as the template, the *armH1* cDNA was amplified by PCR using *Pfu* polymerase (94°C for 2 min; 40 cycles of 94°C for 40 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 4 min; final extension at 72°C for 10 min) and oligonucleotide primers cHalF1 and cHalR1 (Table 1). The PCR product was ligated into pGem-11Zi(−) via EcoRI and BamHI to yield the plasmid pMM1. After sequencing, a correct clone was used as a template for a second PCR under the following conditions: *Pfu* polymerase and primers Hal1-28F and Hal1-28R for 25 cycles (94°C for 40 s, 55°C for 30 s, 72°C for 4 min, and final extension at 72°C for 7 min). The resulting PCR product was ligated into the NdeI and BamHI sites of the vector pET28a, yielding the plasmid pMM21. The *armH2* cDNA was procured as described for *armH1* but using primer Hal2R2 for first-strand synthesis and oligonucleotide primers Hal2F1 and Hal2R1 for cDNA amplification (Table 1). The PCR product was ligated into the NdeI and BamHI sites of pET28a to give pMM13.

For first-strand synthesis of *armH3* to *armH5*, total RNA was primed with oligo(dT)₁₈ primers and reverse transcribed using RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo). One microliter of first-strand synthesized *armH3* to *armH5* cDNA was amplified in a Phusion DNA polymerase (NEB) PCR using the recommended master mix from the manufacturer with a final MgCl₂ concentration of 2.0 mM. PCRs for *armH3* to *armH5* were primed with oligonucleotide pairs oJT073/oHJ01, oJT040/oJT041, and oJT042/oJT043, respectively (Table 1), using the following thermal-cycling parameters: initial denaturation at 98°C for 30 s; 30 cycles of 98°C for 10 s, 60°C (*armH3*) or 70°C (*armH4* and *armH5*) for 15 s, and 72°C for 2 min; and a final extension for 5 min at 72°C. Amplicons of *armH3* to *armH5* were ligated initially to pJET1.2 using the CloneJet PCR cloning kit and subsequently cut and ligated into equally cut pET28b to produce T7 expression plasmids pJH28 (into NdeI and BamHI sites; *armH3*), pJH14 (into NdeI and HindIII sites; *armH4*), and pJH05 (into NdeI and EcoRI sites; *armH5*). The presence of insert integration was verified by DNA sequencing, and all molecular cloning was done in *Escherichia coli* XL-1 Blue, selected by carbenicillin (pJET1.2) or kanamycin (pET28b).

Cloning of the *E. coli* flavine reductase gene *fre*. The flavine reductase gene (*fre*) was amplified by PCR from genomic *E. coli* DNA using *Pfu* polymerase and primers FreN-F and FreN-R (Table 1) (30 cycles of 94°C for 40 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 4 min and final extension of 72°C for 5 min). The PCR product was cloned into the NdeI and BglII sites of vector pET15b to yield plasmid pMM14.

Heterologous protein production and purification. For production of ArmH1 to ArmH5, *E. coli* KRX was individually transformed with pMM21 (to express *armH1*), pMM13 (*armH2*), pJH28 (*armH3*), pJH14 (*armH4*), or pJH05 (*armH5*). Each transformed *E. coli* strain was grown in 2 \times yeast extract-tryptone (YT) medium (supplemented with kanamycin [50 μ g/ml]) in Erlenmeyer flasks (10 400-ml flasks) at 37°C and 180 rpm to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.4. After cooling to 16°C, the



FIG 2 (A) Physical map of the melleolide-biosynthetic gene cluster. The numbers or names of proteins are shown above the respective genes. Introns are not shown. (B) Comparison of the gene structures for halogenases ArmH1 to ArmH5. The lines represent introns.

TABLE 1 Oligonucleotide primers used in this study

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')
cHalF1	CATCGGATCCCATCATGGAAAGAAC
cHalR1	CTTGAAATAGAATTCGGTTTGCC
cHalR2	CACAGCTCTTCATTATAGCCTAC
FreN-F	AGAAAGCATATGACAACCTTA
FreN-R	AGCTTTTATAGATCTCAGATAAATGCG
Hal1-28F	ATCCCCATATGGAAGAACAAAGTG
Hal1-28R	CTCGGATCCGGTTTGCCGCTAAG
Hal2F1	CAGTTCATATGGTTACACAAGTGCC
Hal2R1	CCCTTTGGATCCAGTCTAAAAATCTACG
Hal2R2	AATTCTAACCCTTTTCGTTACAGTC
oJT040	AGCCACCATATGAGCTCCTATTGCG
oJT041	CTACGTAAGCTTAGTGTACGTTTTTCAGCC
oJT042	ATACCTCATATGCCTTCGGAATACGTGC
oJT043	AAAAGAATTCTTAGGCCCTGACCAATCCAAGC
oJT073	TTTTTCATATGGAAGCGCAAGTGCC
oHJ01	AAAAGGATCCCTAAGCACACACGAG

cells were grown to an OD₆₀₀ of 0.7 and induced with L-rhamnose (0.1% [wt/vol]). After an additional 18 h of shaking at 16°C, the cells were harvested by centrifugation, cooled to 4°C, and lysed by sonication (3 times for 10 s each time). After removal of cell debris by centrifugation, the supernatants were incubated with 2 ml (each) of Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) resin for 1 h at 4°C. The resins were transferred onto gravity flow columns and washed with 100 mM phosphate buffer (pH 7.4; 300 mM NaCl) containing increasing imidazole concentrations (10 mM and 20 mM). Elution was performed with 2.5 ml of 400 mM imidazole. The enzymes were rebuffed in 3.5 ml phosphate buffer (100 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.4) using PD-10 columns (GE Healthcare). For bromination and iodination assays, NaCl was replaced with KBr or KI, respectively. The enzymes were concentrated with a 50-kDa-cutoff Amicon filter (Merck Millipore) and used for subsequent *in vitro* product formation assays. To produce flavin reductase, *E. coli* BL21 transformed with pMM14 was grown in liquid LB medium containing 50 µg/ml carbenicillin at 37°C and 180 rpm to an OD₆₀₀ of 0.5 and then induced with IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (1 mM). Heterologous protein production proceeded overnight at 16°C. Purification of the N-terminally hexahistidine-tagged *E. coli* flavin reductase was carried out as described above for ArmH enzymes.

***In vitro* halogenation assays.** Freshly prepared ArmH enzymes were separately incubated at 25°C overnight in a total volume of 100 µl. The buffer was 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl (or KBr or KI, respectively), pH 7.4. The reaction mixture also contained 2 mM NADH, 10 µM flavin adenine dinucleotide (FAD), 2.4 units *E. coli* flavin reductase (Fre) to supply the respective halogenase with FADH₂, and the acceptor substrate (25 µM melleolide F). Fre activity was determined by following a published procedure (25). Reactions with heat-inactivated enzyme (95°C for 10 min) were run in parallel as negative controls, in particular to exclude nonenzymatic chlorination by hypochlorite that might have formed spontaneously in the assays. To prepare the reaction mixtures for chromatography, they were extracted twice with an equal volume of ethyl acetate plus 1% acetic acid (vol/vol), dried under reduced pressure, and redissolved in 100 µl of methanol.

Liquid chromatography and mass spectrometry. *In vitro* reactions were analyzed on an Agilent 1200 high-performance liquid chromatograph (HPLC) equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column (150 by 4.6 mm; 3.5-µm particle size). Solvent A was 0.1% trifluoroacetate in H₂O, and solvent B was acetonitrile. For melleolide analysis, a linear gradient from 50% B to 100% B within 16 min at a flow rate of 0.7 ml/min was applied, followed by a wash step (100% B) for 5 min. Routine mass spectrometry was performed on an Agilent 1260 chromatograph with a Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column (150 by 4.6 mm; 3.5-µm particle size) cou-

pled with an Agilent 6130 mass detector using electrospray ionization in positive and negative modes and applying the gradient described above. Diode array detection was from a λ of 200 to 500 nm, and chromatograms were extracted at a λ of 254 nm. High-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HR-ESIMS) was performed on a Thermo Accela liquid chromatograph equipped with a Betasil C₁₈ column (150 by 2.1 mm; 3-µm particle size) and fitted to an Exactive Orbitrap mass spectrometer (ThermoFisher). Solvent A was 0.1% formic acid in H₂O, and solvent B was 0.1% formic acid in acetonitrile. For sample analysis, the column was washed with 95% H₂O for 1 min, followed by a linear gradient (flow rate, 0.2 ml/min) from 5% B to 98% B within 15 min, and held at this relationship for 3 min.

***In silico* sequence and phylogenetic analysis.** To identify exon-intron junctions *in silico*, we used FGENESH (Softberry, Mount Kisco, NY) and Augustus (26) software as described previously (27). Primary sequences of FAD-dependent halogenases were aligned using the MUSCLE algorithm (28) implemented as a plug-in for Geneious 7.1 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand). The alignment was exported and used to construct a phylogenetic network based on the neighbor net method implemented in the SplitsTree4 program (29). For the construction of a phylogenetic tree, the alignment was exported to MEGA6 (30). Based on a neighbor-joining tree, the optimal model of evolution was determined to be the Le-Gascuel (LG) model (31). A maximum-likelihood (ML) analysis was run using the LG model with 1,000 bootstrap replicates. A FAD-dependent *p*-hydroxybenzoate hydroxylase (PHBH) (Molecular Modeling Database [MMDB] accession no. 57109) from *Pseudomonas fluorescens* was used as the outgroup to root the tree. The GenBank accession numbers of all proteins are compiled in Table S1 in the supplemental material. For phylogenetic analysis, the sequences of the tryptophan halogenases RebH (32), PrnA (33), and PyrH (34) were used, all of them acting on free precursor molecules. We also included SgcC3, involved in halogenation of the enediene antitumor substance C-1027 (17), BhaA from balhimycin biosynthesis (35), and PltA from pyoluteorin biosynthesis (36). All of the last four enzymes have been shown experimentally to depend on carrier-protein-bound intermediates. The halogenase CndH (37) was suggested to interact with a carrier protein, as well, although direct evidence was not provided. AviH from *Streptomyces viridochromogenes* was included, as it chlorinates an orsellinic acid moiety at two positions during avilamycin biosynthesis (38), as well as the halogenase CalO3, which transfers iodine to orsellinic acid (19). Along with the five *A. mellea* halogenases, we included uncharacterized basidiomycete halogenases of *Heterobasidion irregulare* (39) and *Serpula lacrymans* (40) and characterized halogenases from ascomycetes to the phylogenetic analysis. From the latter group of fungi, we added Rdc2 (41) and RadH (16), both involved in radicicol biosynthesis, as well as Gslf of *Penicillium aethiopicum*, which is encoded in the griseofulvin gene cluster (18); PtaM from pestheic acid biosynthesis in *Pestalotiopsis fici* (42); GedL from the geodin pathway in *Aspergillus terreus* (43); and AclH from the aspirochlorine pathway in *Aspergillus oryzae* (44). To root the tree, we used the FAD-dependent PHBH of *P. fluorescens* (45) as the outgroup.

Nucleotide sequence accession numbers. The DNA sequences of *armH3* to *armH5* were deposited in GenBank under the accession numbers KT819179 to KT819181, respectively.

RESULTS

The melleolide gene cluster lacks a halogenase gene. In order to study the genetic basis underlying melleolide biosynthesis, we first searched the genomic sequence of *A. mellea* DSM3731 (13) using the primary sequences of the protoilludene cyclase Pro1 and the polyketide synthase ArmB (11, 12). Notably, the query sequences hit loci that were separated by only nine genes. The result pointed to a clustered arrangement of melleolide biosynthesis genes. This putative gene cluster includes five genes coding for P₄₅₀-dependent monooxygenases (Fig. 2A, proteins 476 and 479 to 482), four NAD⁺-dependent oxidoreductases (proteins 468, 469, 474, and

TABLE 2 Active halogenases/halogenase genes of *A. mellea*

Protein name	Length (aa) ^a	Protein ID ^b	GenBank accession no.	No. of introns in gene	Sequence similarity (%) ^c
ArmH1	522	10956	JF739169	9	
ArmH2	516	2897	JF739170	9	68.3
ArmH3	504	9219	KT819179	9	79.7
ArmH4	533	168	KT819180	10	56.8
ArmH5	523	2211	KT819181	9	49.7

^a aa, amino acids.

^b The protein identifier (ID) refers to the *A. mellea* genome project, as provided through the Joint Genome Institute and by Collins et al. (13).

^c Percentage of amino acids identical to ArmH1's.

478), one flavin-dependent oxidoreductase (protein 475), and one *O*-methyltransferase (protein 473). The P₄₅₀-dependent enzymes may be involved in protoilludene hydroxylation to elaborate melleolides with multiple alcohol groups, such as melleolide D (3), which carries alcohol functionalities at C-4, C-5, C-10, and C-13. The role of the NAD⁺-dependent enzymes remains unknown. Numerous melleolides, e.g., arnamial (6), show 5'-*O*-methylation of the aromatic moiety. This methylation step may be catalyzed by the methyltransferase encoded in the cluster. Searching for a halogenase, a potential candidate encoded in the cluster is the flavin-dependent oxidoreductase (protein 475). However, it lacks the strongly conserved motif GWXWXXPL (34) of FAD-dependent halogenases and showed homology to glucose-methanol-choline oxidoreductase instead. Thus, we hypothesized that protein 475 does not possess halogenase activity but might represent the dehydrogenase yielding the aldehyde in position 1 of arnamial and other melleolides. In turn, this suggested that the halogenase required for melleolide chlorination is not encoded in the gene cluster.

Identification of halogenase genes in the *A. mellea* genome.

Prior to the release of the *A. mellea* genomic sequence, we identified the sequences of *armH1* and *armH2* (GenBank accession no. JF739169 and JF739170), i.e., two genes coding for putative flavin-dependent halogenases. These two genes are located on a contiguous 71.5-kb portion of the *A. mellea* genome (22) that is not part of the melleolide biosynthesis gene cluster. By searching the genomic sequence, we have now identified three additional putative halogenase genes, here referred to as *armH3*, *armH4*, and *armH5* (GenBank accession no. KT819179 through KT819181), which are located neither within nor near the melleolide gene locus nor close to *armH1* and *armH2*. For all five halogenase genes (*armH1* to *armH5*), cDNA was successfully procured from mycelium, confirming they are actively transcribed genes. Another two gene models encoding putative halogenases were incomplete, with missing portions across the respective genes, which is why we assume misassembled sequence data or pseudogenes.

The reading frames of the genes *armH1*, *armH2*, *armH3*, and *armH5* are disrupted by 9 and that of *armH4* by 10 introns (Fig. 2B) and encode ArmH1 to ArmH5 (Table 2), which possess the canonical halogenase signature sequence (GW[A/V]W[F/L]I) of hydrophobic and aromatic residues.

In vitro characterization of *A. mellea* halogenases ArmH1 to ArmH5. To test if any or all of the five *A. mellea* halogenases function in chlorine transfer during melleolide biosynthesis, we expressed their coding sequences heterologously in *E. coli* KRX so as to produce N-terminally hexahistidine-tagged fusion proteins. The enzymes were purified by metal affinity and anion-exchange

chromatography (Fig. 3) and characterized *in vitro*. Melleolide F (Fig. 1) (46) is a typical representative of the melleolide family of compounds that features a $\Delta^{2,3}$ -protoilludene terpene and an unmodified orsellinic acid moiety. Melleolide F can be procured from mycelial cultures in sufficient quantity and was used as a potential chlorine acceptor substrate in this study.

Product formation was investigated by HPLC and HR-ESIMS. When given free melleolide F as the substrate, product formation could be proven in the chromatograms for all five ArmH enzymes by HPLC analysis. In addition to the melleolide F peak at a retention time (*t_R*) of 10.8 min, formation of a chlorinated product was chromatographically verified at a *t_R* of 11.6 min (Fig. 4A to E). In the high-resolution mass spectra for ArmH1 to ArmH5 reactions, the new peaks corresponded to the mass of 6'-chloromelleolide F (Table 3) and displayed the typical pattern for isotopic abundance of the stable chlorine isotopes ³⁵Cl and ³⁷Cl. Based on the areas under the curve, product formation was most pronounced with ArmH4.

Bromination by ArmH4. We selected ArmH4 as a model to gain insight into the biosynthetic capacities of *A. mellea* halogenases. As it has been established that chlorinases may also catalyze bromination, at least *in vitro* (34), *in vitro* product formation assays were performed as described above but with addition of the potassium salts of iodide or bromide, rather than sodium chlo-

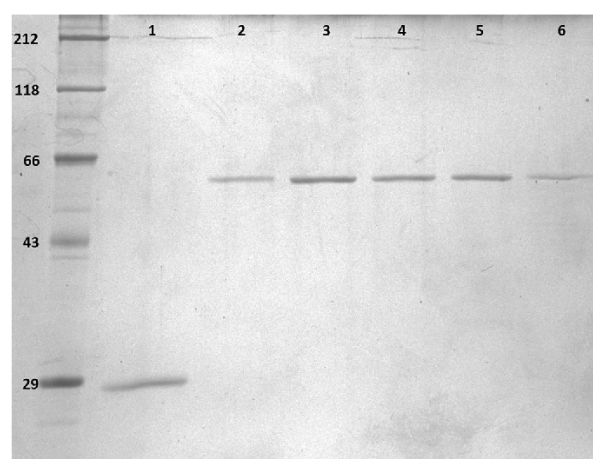


FIG 3 SDS-polyacrylamide gel of heterologously produced and purified *E. coli* flavin reductase (lane 1) and *A. mellea* halogenases ArmH1 to ArmH5 (lanes 2 to 6). Left lane, molecular mass markers; sizes in kilodaltons are indicated.

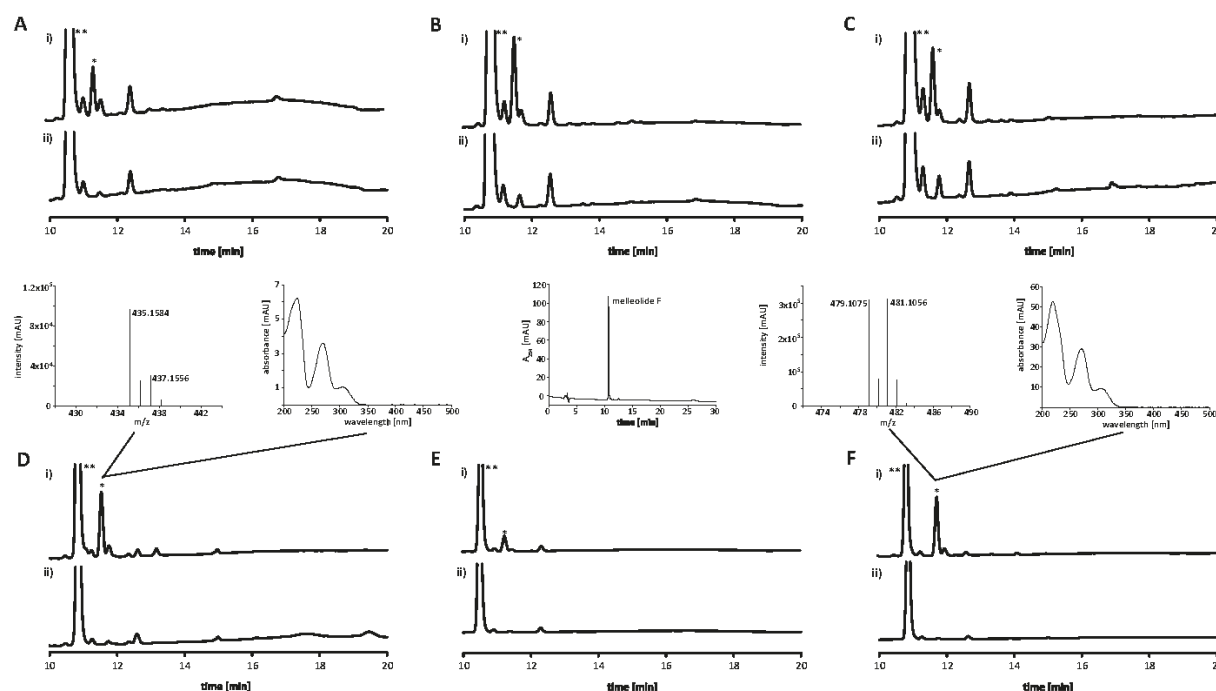


FIG 4 HPLC profiles of ArmH-catalyzed *in vitro* halogenation assays. (A to E) Results for ArmH1 through ArmH5, respectively. Within each panel, chromatogram i shows the enzymatic reaction with melleolide F and chromatogram ii shows the negative control with heat-treated enzyme. (F) ArmH4 reaction with bromide. The single asterisks mark the product peaks, whose absorption values range between 4 and 15 milli-absorbance units (mAU). The double asterisks mark melleolide F. The insets display HR-ESIMS and UV/visible-light (Vis) spectra of the ArmH4-catalyzed chlorinated and brominated products and a chromatogram of the melleolide F substrate.

ride, as the halogen donor substrate for ArmH4. While iodination was not observed, product formation was detected by HPLC and HR-ESIMS when bromide was present (Fig. 4F). Evidence for melleolide bromination came from the masses m/z 479.1075 and 481.1056 (Table 3) and the unique nearly 1:1 abundance ratio of the stable bromine isotopes ^{79}Br and ^{81}Br (Fig. 4F). These results indicated that a single bromine atom was introduced into melleolide F, likely to C-6', as noted above (Fig. 1).

Functional categories are not applicable to fungal halogenases. It has previously been suggested that halogenases can be grouped according to their substrate requirements (37). Group A

includes enzymes that act on free substrates, while group B requires carrier-bound substrates for catalytic turnover. The authors differentiate these two groups by a phenylalanine residue (Phe312 in CndH, group B), which is equivalent to a glutamate residue (Glu346 in PrnA) in group A enzymes. According to these categories, all *A. mellea* halogenases would fall into group B of carrier-protein-dependent halogenases, as they show a phenylalanine residue (positions 326, 326, 327, 335, and 326 in ArmH1 to ArmH5, respectively). However, our results clearly prove that all of the above-mentioned halogenases act on free substrates and that the halogen-carbon bond is established as a post-PKS-biosynthetic step. This is in agreement with a previous study on the ascomycetous Rdc2 (41), which was shown to chlorinate a free substrate *in vitro* but has a phenylalanine at position 328. We therefore assume that this signature residue—discovered with bacterial enzymes—is not applicable to differentiate halogenases of basidiomycete origin.

To gain more insight into the evolution of FAD-dependent halogenases, we constructed a phylogenetic network (Fig. 5) and an ML tree (see Fig. S1 in the supplemental material) of experimentally characterized FAD-dependent halogenases and some putative halogenases encoded in genomes of basidiomycetes. The resulting network and tree suggested that fungal halogenases form a monophyletic clade. Thus, our phylogenetic analyses support the notion that categorization into group A or B is not applicable to fungal enzymes. We found that the fungal halogenase tree reflects the phylogenetic split

TABLE 3 High-resolution mass spectrometry data on *in vitro*-chlorinated or -brominated melleolide F, using ArmH1 to ArmH5

Halogenase	m/z [M - H] ⁻	
	Found	Calculated
Chlorination		
ArmH1	435.1581	435.1580 ^a
ArmH2	435.1595	435.1580 ^a
ArmH3	435.1600	435.1580 ^a
ArmH4	435.1584	435.1580 ^a
ArmH5	435.1579	435.1580 ^a
Bromination		
ArmH4	479.1075, 481.1056	479.1069, 481.1049 ^b

^a For $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_6\text{Cl}$.

^b For $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_6^{79}\text{Br}$ and $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_6^{81}\text{Br}$, respectively.

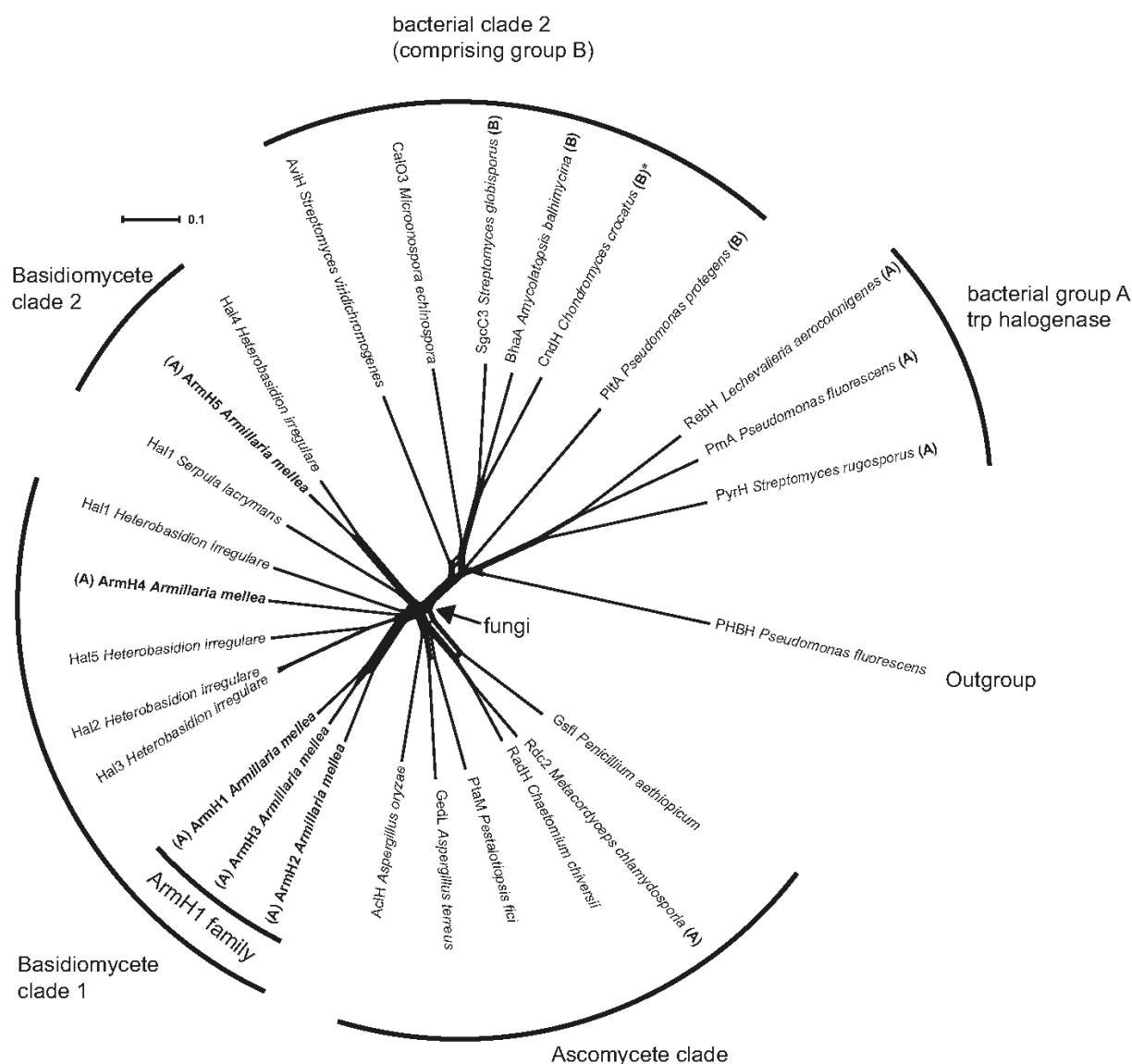


FIG 5 Phylogenetic network of 26 verified and putative halogenases, inferred by the neighbor net method. Fungal halogenases are monophyletic and reflect the phylogenetic split between ascomycetes and basidiomycetes. The functional categories group A (halogenases accepting free substrates) and group B (carrier-protein-bound substrates) are indicated by boldface letters in parentheses. These categories do not strictly correlate with phylogenetic clades. The scale bar indicates the uncorrected pairwise distance. The asterisk indicates a postulated requirement for carrier-protein-bound substrates (37).

between ascomycetes and basidiomycetes. Intriguingly, ArmH1 to ArmH5 are not monophyletic, and only ArmH1 to ArmH3 form a branch of closely related enzymes.

DISCUSSION

Our findings reported here show that halogenases ArmH1 to ArmH5 act on melleolide F, i.e., on free substrates, and that they do not require carrier-protein-tethered intermediates. Cumulatively, we identified these halogenases as melleolide biosynthesis enzymes. We cannot *a priori* exclude the possibility that a position other than C-6' served as an acceptor site for the halogen atom

during catalysis *in vitro*. However, all of the approximately 25 chlorinated melleolides described to date exclusively show 6' chlorination. Thus, a different halogen acceptor position would be inconsistent with all previously established structures.

Mechanistically, different strategies have evolved independently to install halogen atoms onto natural product scaffolds, making use of either the halide anion, hypochlorous acid, or a halogen radical (47, 48). Recently, even a new variant of halogenating enzymes that belongs to the nonheme-iron-dependent halogenases was reported (49). In contrast, our current study focuses on flavin-dependent halogenases, which employ

FAD as a cofactor and use a halide anion and molecular oxygen to produce hypochlorous acid as a halogenating agent. Protein crystallography greatly helped in understanding the structural basis of regioselective formation of the carbon-halogen bond (50–53). *A. mellea* halogenase genes encode the signature motif GW(A/V)W(F/L)I. In the three-dimensional protein structure, these residues line a tunnel inside the enzyme through which the hypochloric acid is routed from the flavin toward the halogen acceptor substrate binding site (50). Also, the active-site lysine was found in all *A. mellea* halogenases (K77 in ArmH5 and K76 in all the others).

Based on the crystal structure of the chondromycin halogenase CndH (37), it has previously been suggested that flavin-dependent halogenases fall into two functionally dissimilar groups accepting free substrates (group A) or carrier-protein-bound substrates (group B). Although all the halogenases investigated in this study, as well as Rdc2 from *Pochonia chlamydosporia*, seem to accept free substrates, there are not enough data yet to assume that this is a general trait of fungal halogenases. However, rules deduced from bacterial sequences to predict their placement in either functional group are not appropriate for fungal halogenases. Alternatively, categorization of enzymes by activity on free versus enzyme-tethered substrates may not be as critical as previously assumed to draw a demarcation line between groups A and B. The type of substrate (tryptophan versus others) also seems to play a role, which would explain the major split (seen in Fig. S1 in the supplemental material) between bacterial clade 1 and all other halogenases. Therefore, further biochemical studies are necessary to shed more light on this fascinating enzyme family, in particular as members of basidiomycete origin have remained completely uninvestigated, even though aromatic haloorganic natural products are known from these fungi. Besides the melleolides, examples include the alcalinaphenols from *Mycena alcalina* (54) and stephanosporin from *Stephanospora caroticolor* (55). Hence, our work represents the first biochemically and genetically characterized basidiomycete halogenases. Phylogenetically, our work also revealed that ArmH1 to ArmH3 have most likely evolved by gene duplication within the *A. mellea* lineage and that ArmH4 and ArmH5 seem to have distinct phylogenetic histories. However, it is premature to speculate if any functional clusters within the fungal clades can be deduced from the phylogenetic tree. Again, more biochemical studies are warranted to improve functional predictions of putative halogenases unveiled by high-throughput-sequencing projects. In various cases, e.g., for the antibiotic vancomycin and the antitumor agent salinosporamide, increased bioactivity has been attributed to the presence of halogen atoms (47). However, in the case of the melleolides, the physiological reason for introducing a chlorine atom is unclear. Available studies on structure-activity relationships do not support strongly changed bioactivity through chlorination (8, 9, 20). Hence, a role in detoxification of melleolides through halogenation also cannot be assumed, and the reason why *A. mellea* secures chlorination of its toxic natural products to the degree described here remains elusive. Although redundantly encoded pathways are known from both ascomycetes and basidiomycetes (56–58), a 5-fold parallelized biosynthetic step is unprecedented and warrants further investigation of the underlying ecological or environmental reason.

ACKNOWLEDGMENTS

A doctoral fellowship awarded by the Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU) to M.M. is gratefully acknowledged. Support by the Collaborative Research Center ChemBioSys (SFB 1127/1) to D.H. and J.T. is acknowledged.

We thank Andrea Perner (Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knöll Institute, Jena, Germany) for recording high-resolution mass spectra.

REFERENCES

- Baumgartner K, Coetzee MP, Hoffmeister D. 2011. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Mol Plant Pathol* 12:515–534. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00693.x>.
- Shaw CG, Kille GA, III. 1991. *Armillaria* root disease. U.S. Department of Agriculture Forest Service handbook no. 691. U.S. Department of Agriculture Forest Service, Washington, DC.
- Arnone A, Cardillo R, Nasini G. 1986. Structures of melleolides B-D, three antibacterial sesquiterpenoids from *Armillaria mellea*. *Phytochemistry* 25:471–474. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85503-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85503-X).
- Bohnert M, Miethbauer S, Dahse HM, Ziemer J, Nett M, Hoffmeister D. 2011. *In vitro* cytotoxicity of melleolide antibiotics: structural and mechanistic aspects. *Bioorg Med Chem Lett* 21:2003–2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.02.026>.
- Donnelly D, Sanada S, O'Reilly J, Polonsky J, Prangé T, Pascard CJ. 1982. Isolation and structure (X-ray analysis) of the orsellinate of armillol, a new antibacterial metabolite from *Armillaria mellea*. *J Chem Soc Chem Commun* 1982:135–137.
- Misiek M, Williams J, Schmich K, Hüttel W, Merfort I, Salomon CE, Aldrich CC, Hoffmeister D. 2009. Structure and cytotoxicity of armillol and related fungal sesquiterpene aryl esters. *J Nat Prod* 72:1888–1891. <http://dx.doi.org/10.1021/np900314p>.
- Yang JS, Chen YW, Feng XZ, Yu DQ, Liang XT. 1984. Chemical constituents of *Armillaria mellea* mycelium I. Isolation and characterization of armillarin and armillaridin. *Planta Med* 50:288–290.
- Bohnert M, Nützmann HW, Schroeckh V, Horn F, Dahse HM, Brakhage AA, Hoffmeister D. 2014. Cytotoxic and antifungal activities of melleolide antibiotics follow dissimilar structure-activity relationships. *Phytochemistry* 105:101–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.05.009>.
- Kobori H, Sekiya A, Suzuki T, Choi JH, Hirai H, Kawagishi H. 2015. Bioactive sesquiterpene aryl esters from the culture broth of *Armillaria* sp. *J Nat Prod* 78:163–167. <http://dx.doi.org/10.1021/np500322t>.
- Peipp H, Sonnenbichler J. 1992. Secondary fungal metabolites and their biological activities. II. Occurrence of antibiotic compounds in cultures of *Armillaria ostoyae* growing in the presence of an antagonistic fungus or host plant cells. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 373:675–683.
- Engels B, Heinig U, Grothe T, Stadler M, Jennewein S. 2011. Cloning and characterization of an *Armillaria gallica* cDNA encoding protoilludene synthase, which catalyzes the first committed step in the synthesis of antimicrobial melleolides. *J Biol Chem* 286:6871–6878. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.165845>.
- Lackner G, Bohnert M, Wick J, Hoffmeister D. 2013. Assembly of melleolide antibiotics involves a polyketide synthase with cross-coupling activity. *Chem Biol* 20:1101–1106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.07.009>.
- Collins C, Keane TM, Turner DJ, O'Keeffe G, Fitzpatrick DA, Doyle S. 2013. Genomic and proteomic dissection of the ubiquitous plant pathogen, *Armillaria mellea*: toward a new infection model system. *J Proteome Res* 12:2552–2570. <http://dx.doi.org/10.1021/pr301131t>.
- Chen X, van Pée KH. 2008. Catalytic mechanisms, basic roles, and biotechnological and environmental significance of halogenating enzymes. *Acta Biochim Biophys Sin* 40:183–193. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00390.x>.
- Reeves CD, Hu Z, Reid R, Kealey JT. 2008. Genes for the biosynthesis of the fungal polyketides hypothemycin from *Hypomyces subiculosus* and radicicol from *Pochonia chlamydosporia*. *Appl Environ Microbiol* 74:5121–5129. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00478-08>.
- Wang S, Xu Y, Maine EA, Wijeratne EM, Espinosa-Artiles P, Gunatilaka AA, Molnár I. 2008. Functional characterization of the biosynthesis of radicicol, an Hsp90 inhibitor resorcylic acid lactone from *Chaetomium*

- chiversii*. Chem Biol 15:1328–1338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.10.006>.
17. Lin S, Van Lanen SG, Shen B. 2007. Regiospecific chlorination of (S)-beta-tyrosyl-S-carrier protein catalyzed by SgcC3 in the biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic C-1027. J Am Chem Soc 129:12432–12438. <http://dx.doi.org/10.1021/ja072311g>.
18. Chooi YH, Cacho R, Tang Y. 2010. Identification of the viridicatumtoxin and griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*. Chem Biol 17:483–494. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.03.015>.
19. Ahlert J, Shepard E, Lomovskaya N, Zazopoulos E, Staffa A, Bachmann BO, Huang K, Fonstein L, Csisny A, Whitwam RE, Farnet CM, Thorson JS. 2002. The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. Science 297:1173–1176. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1072105>.
20. Bohnert M, Scherer O, Wiechmann K, König S, Dahse HM, Hoffmeister D, Werz O. 2014. Melleolides induce rapid cell death in human primary monocytes and cancer cells. Bioorg Med Chem 22:3856–3861. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.06.032>.
21. Shimizu K, Keller NP. 2001. Genetic involvement of a cAMP dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. Genetics 157:591–600.
22. Misiek M, Braesel J, Hoffmeister D. 2011. Characterisation of the ArmA adenylation domain implies a more diverse secondary metabolism in the genus *Armillaria*. Fungal Biol 115:775–781. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2011.06.002>.
23. Nordberg H, Cantor M, Dusheyko S, Hua S, Poliakov A, Shabalov I, Smirnova T, Grigoriev IV, Dubchak I. 2014. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. Nucleic Acids Res 42:D26–D31. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1069>.
24. Schneider P, Weber M, Rosenberger K, Hoffmeister D. 2007. A one-pot chemoenzymatic synthesis to the universal precursor of antidiabetic and antiviral bis-indolylquinones. Chem Biol 14:635–644. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.05.005>.
25. Matsubara T, Ohshiro T, Nishina Y, Izumi Y. 2001. Purification, characterization, and overexpression of flavin reductase involved in dibenzothio-phene desulfurization by *Rhodococcus erythropolis* D-1. Appl Environ Microbiol 67:1179–1184. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.3.1179-1184>.
26. Stanke M, Morgenstern B. 2005. AUGUSTUS: a Web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. Nucleic Acids Res 33:W465–W467. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki458>.
27. Misiek M, Hoffmeister D. 2008. Processing sites involved in intron splicing of *Armillaria* natural product genes. Mycol Res 112:216–224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2007.10.011>.
28. Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res 32:1792–1797. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
29. Huson DH. 1998. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. Bioinformatics 14:68–73. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/14.1.68>.
30. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30:2725–2729. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
31. Le SQ, Gascuel O. 2008. An improved general amino acid replacement matrix. Mol Biol Evol 25:1307–1320. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msn067>.
32. Yeh E, Garneau S, Walsh CT. 2005. Robust *in vitro* activity of RebF and RebH, a two-component reductase/halogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebeccamycin biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 102:3960–3965. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0500755102>.
33. Hammer PE, Hill DS, Lam ST, van Pée KH, Ligon JM. 1997. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. Appl Environ Microbiol 63:2147–2154.
34. Zehner S, Kotzsch A, Bister B, Süßmuth RD, Mendez C, Salas JA, van Pée KH. 2005. A regioselective tryptophan 5-halogenase is involved in pyrroindomycin biosynthesis in *Streptomyces rugosporus* LL-42D005. Chem Biol 12:445–452. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.02.005>.
35. Puk O, Bischoff D, Kittel C, Pelzer S, Weist S, Stegmann E, Süßmuth RD, Wohlleben W. 2004. Biosynthesis of chloro-beta-hydroxytyrosine, a nonproteinogenic amino acid of the peptidic backbone of glycopeptide antibiotics. J Bacteriol 186:6093–6100. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.186.18.6093-6100.2004>.
36. Dorrestein PC, Yeh E, Garneau-Tsodikova S, Kelleher NL, Walsh CT. 2005. Dichlorination of a pyrrolyl-S-carrier protein by FADH₂-dependent halogenase PltA during pyroluteorin biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 102:13843–13848. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0506964102>.
37. Buedenbender S, Rachid S, Müller R, Schulz GE. 2009. Structure and action of the myxobacterial chondrochlorin halogenase CndH: a new variant of FAD-dependent halogenases. J Mol Biol 385:520–530. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.057>.
38. Weitnauer G, Mühlenweg A, Trefzer A, Hoffmeister D, Süßmuth RD, Jung G, Welzel K, Vente A, Girreser U, Bechthold A. 2001. Biosynthesis of the orthosomycin antibiotic avilamycin A: deductions from the molecular analysis of the *avi* biosynthetic gene cluster of *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 and production of new antibiotics. Chem Biol 8:569–581. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00040-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00040-0).
39. Olson A, Aerts A, Asiegbu F, Belbahri L, Bouzid O, Broberg A, Canbäck B, Coutinho PM, Cullen D, Dalman K, Defflorio G, van Diepen LT, Dunand C, Duplessis S, Durling M, Gonthier P, Grimwood J, Fossdal CG, Hansson D, Henrissat B, Hietala A, Himmelstrand K, Hoffmeister D, Höglberg N, James TY, Karlsson M, Kohler A, Kües U, Lee YH, Lin YC, Lind M, Lindquist E, Lombard V, Lucas S, Lundén K, Morin E, Murat C, Park J, Raffaello T, Rouzé P, Salamov A, Schmutz J, Solheim H, Ståhlberg J, Véléz H, de Vries RP, Wiebenga A, Woodward S, Yakovlev I, Garbelotto M, Martin F, Grigoriev IV, Stenlid J. 2012. Insight into trade-off between wood decay and parasitism from the genome of a fungal forest pathogen. New Phytol 194:1001–1013. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04128.x>.
40. Eastwood DC, Floudas D, Binder M, Majcherczyk A, Schneider P, Aerts A, Asiegbu FO, Baker SE, Barry K, Bendiksby M, Blumentritt M, Coutinho PM, Cullen D, de Vries RP, Gathman A, Goodell B, Henrissat B, Ihrmark K, Kausserud H, Kohler A, LaButti K, Lapidus A, Lavin JL, Lee YH, Lindquist E, Lilly W, Lucas S, Morin E, Murat C, Oguiza JA, Park J, Pisabarro AG, Riley R, Rosling A, Salamov A, Schmidt O, Schmutz J, Skrede I, Stenlid J, Wiebenga A, Xie X, Kües U, Hibbett DS, Hoffmeister D, Höglberg N, Martin F, Grigoriev IV, Watkinson SC. 2011. The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. Science 333:762–765. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1205411>.
41. Zeng J, Zhan J. 2010. A novel fungal flavin-dependent halogenase for natural product biosynthesis. ChemBioChem 11:2119–2123. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201000439>.
42. Xu X, Liu L, Zhang F, Wang W, Li J, Guo L, Che Y, Liu G. 2014. Identification of the first diphenyl ether gene cluster for pesticide acid biosynthesis in plant endophyte *Pestalotiopsis fici*. ChemBioChem 15:284–292. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201300626>.
43. Nielsen MT, Nielsen JB, Anyaogu DC, Holm DK, Nielsen KF, Larsen TO, Mortensen UH. 2013. Heterologous reconstitution of the intact geodin gene cluster in *Aspergillus nidulans* through a simple and versatile PCR based approach. PLoS One 8:e72871. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072871>.
44. Chankhamjon P, Boettger-Schmidt D, Scherlach K, Urbansky B, Lackner G, Kalb D, Dahse HM, Hoffmeister D, Hertweck C. 2014. Biosynthesis of the halogenated mycotoxin aspirochlorine in koji mold involves a cryptic amino acid conversion. Angew Chem Int Ed Engl 53:13409–13413. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201407624>.
45. Schreuder HA, van der Laan JM, Hol WG, Drenth J. 1988. Crystal structure of p-hydroxybenzoate hydroxylase complexed with its reaction product 3,4-dihydroxybenzoate. J Mol Biol 199:637–648. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90307-5](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(88)90307-5).
46. Arnone A, Cardillo R, Di Modugno V, Nasini G. 1988. Isolation and structure elucidation of melleonal D and E and melleolides E-H, novel sesquiterpenoid aryl esters from *Clitocybe elegans* and *Armillaria mellea*. Gazz Chim Ital 118:517–521.
47. Neumann CS, Fujimori DG, Walsh CT. 2008. Halogenation strategies in natural product biosynthesis. Chem Biol 15:99–109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.01.006>.
48. van Pée KH. 2012. Enzymatic chlorination and bromination. Methods Enzymol 516:237–257. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394291-3.00004-6>.
49. Hillwig ML, Liu X. 2014. A new family of iron-dependent halogenases acts on freestanding substrates. Nat Chem Biol 10:921–923. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1625>.
50. Dong C, Flecks S, Unversucht S, Haupt C, van Pée KH, Naismith JH. 2005. Tryptophan 7-halogenase (PnA) structure suggests a mechanism

- for regioselective chlorination. *Science* 309:2216–2219. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1116510>.
51. Bitto E, Huang Y, Bingman CA, Singh S, Thorson JS, Phillips GN, Jr. 2008. The structure of flavin-dependent tryptophan 7-halogenase RebH. *Proteins* 70:289–299.
 52. Zhu X, De Laurentis W, Leang K, Herrmann J, Ihlefeld K, van Pée KH, Naismith JH. 2009. Structural insights into regioselectivity in the enzymatic chlorination of tryptophan. *J Mol Biol* 391:74–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.06.008>.
 53. Podzelinska K, Latimer R, Bhattacharya A, Vining LC, Zechel DL, Jia Z. 2010. Chloramphenicol biosynthesis: the structure of CmlS, a flavin-dependent halogenase showing a covalent flavin-aspartate bond. *J Mol Biol* 397:316–331. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.020>.
 54. Peters S, Spiteller P. 2006. Chloro- and bromophenols from cultures of *Mycena alcalina*. *J Nat Prod* 69:1809–1812. <http://dx.doi.org/10.1021/np0603368>.
 55. Lang M, Spiteller P, Hellwig V, Steglich W. 2001. Stephanosporin, a traceless precursor of 2-chloro-4-nitrophenol in the gasteromycete *Stephanospora caroticolor*. *Angew Chem Int Ed Engl* 40:1704–1705. [http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773\(20010504\)40:9<1704::AID-ANIE17040>3.0.CO;2-L](http://dx.doi.org/10.1002/1521-3773(20010504)40:9<1704::AID-ANIE17040>3.0.CO;2-L).
 56. Forseth RR, Amaike S, Schwenk D, Affeldt KJ, Hoffmeister D, Schroeder FC, Keller NP. 2013. Homologous NRPS-like gene clusters mediate redundant small-molecule biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Angew Chem Int Ed Engl* 52:1590–1594. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201207456>.
 57. Braesel J, Götze S, Shah F, Heine D, Tauber J, Hertweck C, Tunlid A, Stallforth P, Hoffmeister D. 2015. Three redundant synthetases secure redox-active pigment production in the basidiomycete *Paxillus involutus*. *Chem Biol* 22:1325–1334. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.08.016>.
 58. Throckmorton K, Lim FY, Kontoyiannis DP, Zheng W, Keller NP. 4 August 2015. Redundant synthesis of a conidial polyketide by two distinct secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*. *Environ Microbiol* <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.13007>.

Supplemental Material

A fivefold parallelized biosynthetic process secures chlorination of *Armillaria mellea* (honey mushroom) toxins

Jonas Wick^a, Daniel Heine^b, Gerald Lackner^c, Mathias Misiek^a, James Tauber^a, Hans Jagusch^a, Christian Hertweck^b, Dirk Hoffmeister^{a,#}

^aDepartment Pharmaceutical Microbiology at the Hans Knöll Institute, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena, Germany

^bDepartment of Biomolecular Chemistry, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology - Hans Knöll Institute, Beutenbergstraße 11a, 07745 Jena, Germany

^cInstitute of Microbiology, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Vladimir-Prelog-Weg 1-5, 8093 Zürich, Switzerland.

*Corresponding author. Tel.: +49 3641 949851; fax: +49 3641 949852. E-mail address: dirk.hoffmeister@leibniz-hki.de

Running title: *Armillaria mellea* (honey mushroom) halogenases

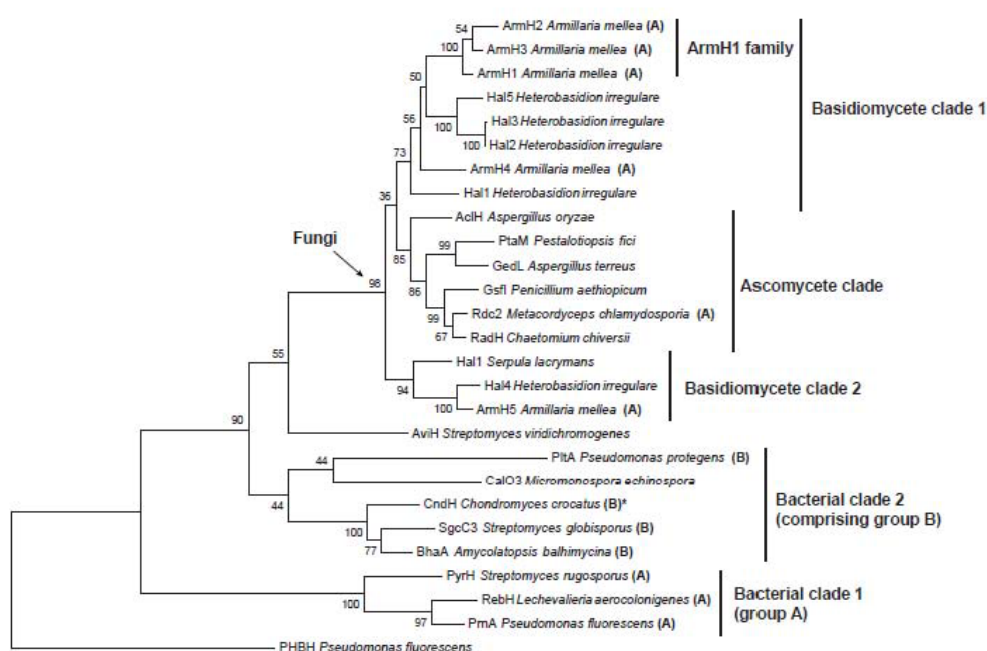


Fig. S1. Phylogenetic tree of 26 verified and putative halogenases inferred by the Maximum Likelihood method based on the LG model [1]. The tree with the highest log likelihood (-10885.8435) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches (bootstrap values). The functional categories A (halogenases accepting free substrates) and group B (carrier protein-bound substrates) are indicated by bold letters in parentheses. These categories are not strictly correlated with phylogenetic clades. The *p*-hydroxybenzoate hydroxylase (PHBH) from *Pseudomonas fluorescens* was added as outgroup.

1. **Le SQ, Gascuel O.** 2008. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol* **25**:1307-1320.

Table S1: Putative and characterized halogenases used for phylogenetic studies.

Name	Accession	Organism	Sequence Length
SgcC3_Streptomyces_globisporus	AAL06656.1	<i>Streptomyces globisporus</i>	494
RebH_Lechevalieria_aerocolonigenes	Q8KHZ8.1	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	530
Rdc2_Metacordyceps_chlamydosporia	ADM86580.1	<i>Metacordyceps chlamydosporia</i>	533
RadH_Chaetomium_chiversii	ACM42402.1	<i>Chaetomium chiversii</i>	520
PyrH_Streptomyces_rugosporus	AU95674.1	<i>Streptomyces rugosporus</i>	511
PtaM_Pestalotiopsis_fici	AGO59046	<i>Pestalotiopsis fici</i>	540
PrnA_Pseudomonas_fluorescens	P95480.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	538
PltA_Pseudomonas_protegens	AAY92059	<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	449
PHBH_Pseudomonas_fluorescens	1PHH	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	394
Hal5_Heterobasidion_irregulare	ETW79545	<i>Heterobasidion irregulare</i> TC 32-1	535
Hal4_Heterobasidion_irregulare	ETW77133	<i>Heterobasidion irregulare</i> TC 32-1	519
Hal3_Heterobasidion_irregulare	ETW76184	<i>Heterobasidion irregulare</i> TC 32-1	524
Hal2_Heterobasidion_irregulare	ETW76158	<i>Heterobasidion irregulare</i> TC 32-1	529
Hal1_Serpula_lacrymans	EGO19147	<i>Serpula lacrymans</i> var. lacrymans S7.9	668
Hal1_Heterobasidion_irregulare	ETW75821	<i>Heterobasidion irregulare</i> TC 32-1	567
Gsfl_Penicillium_aethiopicum	ADI24948	<i>Penicillium aethiopicum</i>	533
GedL_AspERGILLUS_terreus	XP_001217599	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624	500
CndH_Chondromyces_crocatus	CAQ43074.1	<i>Chondromyces crocatus</i>	512
ChIA_Dictyostelium_discoideum	XP_635556.1	<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4	601
CalO3_Micromonospora_echinospora	AM70353.1	<i>Micromonospora echinospora</i>	420
BhaA_Amycolatopsis_balhimycina	CAA76550	<i>Amycolatopsis balhimycina</i> DSM 5908	491
AviH_Streptomyces_viridichromogenes	AF333038	<i>Streptomyces viridichromogenes</i> Tu57	499
ArmH5_Armillaria_mellea		<i>Armillaria mellea</i> DSM3731	523
ArmH4_Armillaria_mellea		<i>Armillaria mellea</i> DSM3731	533
ArmH3_Armillaria_mellea		<i>Armillaria mellea</i> DSM3731	504
ArmH2_Armillaria_mellea	JF739170	<i>Armillaria mellea</i> DSM3731	516
ArmH1_Armillaria_mellea	JF739169	<i>Armillaria mellea</i> DSM3731	522
AclH_AspERGILLUS_oryzae	XP_001818590	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	549

3.2 Publikation 2, Lenz *et al.* (2017), *Journal of Natural Products*

Identification of ω -N-Methyl-4-hydroxytryptamine (Norpsilocin) as a *Psilocybe* Natural Product.

Claudius Lenz*, Jonas Wick*, Dirk Hoffmeister.

J. Nat. Prod (2017)

Psilocybe cubensis produziert die psychotropen Indolalkaloide Psilocin, Psilocybin und Baeocystin. Für den relativen Inhalt dieser Alkaloide zueinander wurden in der bisherigen Literatur sehr unterschiedliche Werte angegeben. Über verschiedene Aufarbeitungs- und Extraktionsmethoden konnte gezeigt werden, dass diese einen erheblichen Einfluss auf die relative Zusammensetzung der Indolalkaloide hat. Gerade bisherige Angaben zu dem oft recht hohen Psilocingehalt psilocybinhaltiger Pilze sind demnach vermutlich artifiziell. Des Weiteren konnte Norpsilocin als neuer Naturstoff in Extrakten von *P. cubensis* identifiziert werden

*C. Lenz und J. Wick haben zu gleichen Teilen zur Publikation beigetragen.

Angaben zum Eigenanteil von J. Wick: [40 %]

Anzucht von *P. cubensis*, Entwicklung und Anwendung unterschiedlicher Methoden zur Extraktion von unterschiedlich getrockneten Fruchtkörpern von *P. cubensis*, Extraktion von Norpsilocin aus Fruchtkörpern von *P. cubensis*, HPLC-Analytik, Mitarbeit bei der Auswertung der NMR-Daten, Mitarbeit bei der Erstellung des Manuskriptes

Jena den

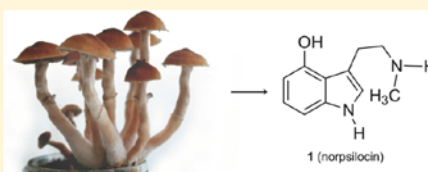
Prof. Dr. Dirk Hoffmeister

Identification of ω -*N*-Methyl-4-hydroxytryptamine (Norpsilocin) as a *Psilocybe* Natural ProductClaudius Lenz,[†] Jonas Wick,[†] and Dirk Hoffmeister^{*,‡}

Department of Pharmaceutical Microbiology at the Hans-Knöll-Institute, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Winzerlaer Strasse 2, 07745 Jena, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: We report the identification of ω -*N*-methyl-4-hydroxytryptamine (norpsilocin, **1**) from the carpophores of the hallucinogenic mushroom *Psilocybe cubensis*. The structure was elucidated by 1D and 2D NMR spectroscopy and high-resolution mass spectrometry. Norpsilocin has not previously been reported as a natural product. It likely represents the actual psychotropic agent liberated from its 4-phosphate ester derivative, the known natural product baeocystin. We further present a simple and artifact-free extraction method that prevents dephosphorylation and therefore helps reflect the naturally occurring metabolic profile of *Psilocybe* mushrooms in subsequent analyses.



Numerous fungi of the basidiomycete genus *Psilocybe* and other genera, colloquially called magic mushrooms, elicit profound changes in mood and perception following ingestion. The psychotropic effects are due to the tryptamine derivatives psilocin and its 4-*O*-phosphate ester, psilocybin, which are synthesized by these fungi.¹ These metabolites have been extracted side-by-side from these mushrooms.^{2,3} Psilocybin represents the terminal pathway product and a prodrug, as it becomes rapidly dephosphorylated following oral ingestion to yield the actual psychotropically active psilocin.^{4,5} This compound acts primarily as a partial agonist on 5HT_{1A}, 5HT_{2A}, and 5HT_{2C} receptors.⁶ Psilocin and psilocybin were first described by Hofmann and co-workers.¹ Over the following decades, synthetic psilocybin derivatives and naturally occurring congeners have been documented, including baeocystin, norbaeocystin, and aeruginascin.^{7–9} They are biosynthesized from *L*-tryptophan by successive decarboxylation, mono-, di-, and trimethylation, respectively, of the amino nitrogen, 4-hydroxylation, and formation of the phosphate ester.¹⁰ Following this biosynthetic cascade, ω -*N*-methyl-4-hydroxytryptamine (norpsilocin, **1**) can be postulated as the immediate precursor of baeocystin. A very recent *in vitro* study¹¹ suggests that **1** directly derives from 4-hydroxytryptamine as the product of a minor shunt pathway and is then phosphorylated into baeocystin. However, compound **1**, described as a synthetic product and by artificially dephosphorylated *Psilocybe* extracts,^{9,12,13} has never been identified as a natural product. Here, we describe **1** as a natural product of *Psilocybe cubensis*.

During chemical analysis of *P. cubensis* carpophore extracts, psilocin and psilocybin, along with minor amounts of baeocystin and tryptophan, were identified by LC/ESIMS (Figure 1A). Surprisingly, in the chromatogram, recorded at $\lambda = 280$ nm, an additional minor signal at $t_R = 10.6$ min was detected that featured the typical psilocybin signature UV–vis spectrum indicating a 4-hydroxyindole moiety. Further, the

signal corresponded to a mass of m/z 191.1178 [$M + H$]⁺ (calcd for C₁₁H₁₅N₂O 191.1179), which is inconsistent with all known *Psilocybe* alkaloids, but matches that of psilocin (m/z 205.1 [$M + H$]⁺) less a methyl group. As such a natural product has not been described yet, we sought to follow up on this observation. The compound was purified from 200 g (fresh weight) of *P. cubensis* carpophores by preparative and semipreparative RP-HPLC, which yielded 3 mg of pure compound. Subsequently, 1D and 2D NMR spectra were recorded (Table 1, Figures S1–S5). The chemical shifts and coupling constants of the ¹H NMR data indicated a typical indole ring system, except that only three aromatic signals were observed (δ 6.40, H-5, δ 6.88 H-7, and δ 6.93, H-6), which suggested a substituted aromatic ring. The coupling pattern showed three double doublets, suggesting three adjacent protons and thus a 4- or 7-hydroxylation. Subsequent HMBC spectroscopy revealed *J*₃ coupling between the H-7 proton and C-3a and C-5, which excludes an alcohol functionality at this position. Evidence for a monomethylated, i.e., secondary, amine came from the integral of the methyl proton signal at δ 2.71 ppm, suggesting only three magnetically equivalent protons, as opposed to six protons with psilocin. Therefore, we unequivocally demonstrated that the isolated compound is identical to ω -*N*-methyl-4-hydroxytryptamine (norpsilocin, **1**, 3-[2-(methylamino)ethyl]-1*H*-indol-4-ol, Figure 1).

We could not discount a scenario where **1** represents an artifact that may have occurred through hydrolysis of the phosphate ester of baeocystin. Previous research showed that different carpophore extraction methods heavily impact the metabolic profile, as dephosphorylation of psilocybin can occur enzymatically as well as thermally.^{2,14} Therefore, we investigated if the alkaloid profile of the fungus is impacted by how

Received: May 10, 2017

Published: September 20, 2017

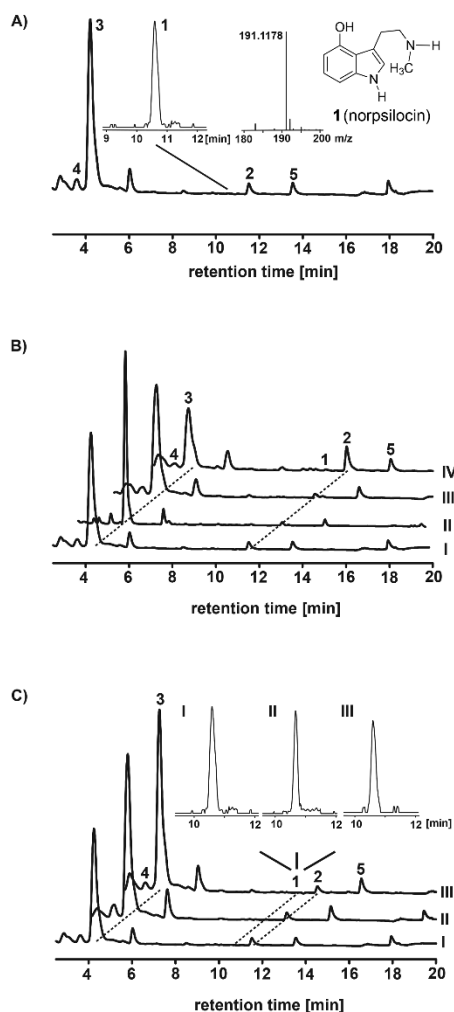


Figure 1. Chromatographic analysis of *Psilocybe* natural products. Compounds with indole UV-vis spectra are indicated by numbers: norpsilocin (1, t_R = 10.6 min), psilocin (2, t_R = 11.5 min), psilocybin (3, t_R = 4.1 min), baecocystin (4, t_R = 3.8 min), and tryptophan (5, t_R = 13.6 min). (A) HPL chromatographic detection of 1 after artifact-free extraction. The insets show the extracted ion chromatogram of 1 and the mass spectrum at t_R = 10.6 min. (B) Comparison of metabolic profiles after processing the carpophores by quick freezing and lyophilization (trace I), lyophilized carpophores extracted under aqueous conditions (trace II), drying at T = 37 °C prior to extraction (trace III), or using unprocessed carpophores (trace IV). (C) Comparison of metabolic profiles of *P. cubensis* isolates FSU 12407 (trace I), FSU12410 (trace II), and DSM-2530 (trace III). The insets show the extracted ion chromatograms for m/z 190.7–191.7 that prove the presence of 1 (t_R = 10.6 min) in all extracts.

the carpophore is processed prior to chromatographic analysis. Carpophores of *P. cubensis* isolate FSU12407 were harvested and either shock-frozen in liquid nitrogen and lyophilized or gradually dried at 37 °C over 2 days (protocols 1 and 3, respectively, in the Experimental Section). Lyophilized carpophores were alternatively extracted with a methanol–water mixture (4:1, v/v) to simulate the effect of water during extraction of dried biomass (protocol 2). In a fourth approach,

Table 1. NMR Spectroscopic Data for Norpsilocin (1)^a

no.	δ_C , mult	δ_H , M (J in Hz)	HMBC
1			
2	123.9, CH	7.02, s	2, 3, 3a, 7a
3	111.0, C		
3a ^b	118.6, C		
4	153.5, C		
5	104.9, CH	6.40, dd (7.4, 1.0)	3a, 7
6	124.7, CH	6.93, dd (8.2, 7.4)	4, 7a
7	105.3, CH	6.88, dd (8.2, 1.0)	3a, 5
7a	141.7, C		
1'	53.2, CH ₂	3.42, t (6.9)	2', 3, N-CH ₃
2'	25.9, CH ₂	3.26, t (6.9)	1', 2, 3, 3a
N-CH ₃	34.5	2.71, s	1'
N-H		n.o. ^c	
4-OH		n.o.	

^aMeOH-*d*₄, 500 MHz for ¹H NMR, 125 MHz for ¹³C NMR.

^bChemical shift of C-3a obtained from HMBC data. ^cNot observed.

the material was not dried at all (protocol 4). Inherent to these latter two methods, the natural products are exposed to water, either added or released by the disintegrating fungal cells during workup. In contrast, lyophilization of carpophores prior to extraction aimed at providing very mild conditions through minimized exposure to water. Subsequently, the carpophores were extracted with anhydrous methanol by shaking at ambient temperature. The respective extracts were qualitatively and quantitatively analyzed by LC/ESIMS (Figure 1B), which revealed that psilocybin, psilocin, baecocystin, and 1 were all present, regardless of the chosen method. However, quantitative differences of the indole alkaloid profile were observed which appeared in agreement with prior literature that reports dephosphorylation under aqueous conditions.^{2,14} The relative amounts of norpsilocin and psilocin increased when the undried fungus was subjected to aqueous conditions and maintained close to room temperature for extended periods of time. When comparing areas under the curve, lyophilized basidiocarps showed a ratio of psilocybin:psilocin of 15:1, while basidiocarps that had not been dried showed a ratio of 5:1. Intriguingly, lyophilized carpophores extracted with a methanol–water mixture showed no increased dephosphorylation of psilocybin, and psilocin contents were also low (Figure 1B, trace II).

For *P. cubensis*, two studies investigated the amount of psilocybin and psilocin in dry biomass. Contents of 0.63% psilocybin and 0.11% psilocin are reported by one of the studies² and 1.07% psilocybin and 0.18% psilocin by the other.¹⁵ Both studies therefore consistently report a 6-fold higher concentration of psilocybin over psilocin. By extracting fresh and/or poorly dried carpophores, the previous reports may have overestimated the natural psilocin concentrations in the fungus. Our results indicate that the drying process itself determines dephosphorylation and that the presence of water after drying is of minor relevance. This, in turn, supports the view that dephosphorylation is an enzymatically catalyzed, rather than spontaneous, process. To exclude strain-to-strain variation, we repeated the experiment by extracting carpophores of two other *P. cubensis* isolates (FSU12410 and DSM-2530), again applying mild conditions to prevent 4-O-phosphate ester cleavage. LC/ESIMS analysis revealed a virtually interchangeable metabolite profile, which confirmed

the presence of **1** in all isolates and comparably low psilocin contents (Figure 1C).

Considering the reported psychotropic effects of baeocystin,¹⁶ **1** very likely represents its actual psychoactive form after 4-*O*-dephosphorylation *in vivo*. This assumption is made by analogy to the psilocybin/psilocin pair of alkaloids. For psilocybin, 10 mg is considered a low oral dose.¹⁷ A self-experiment that included ingestion of 4 mg of baeocystin suggested that it is not more potent than psilocybin.¹⁶ Given the very low concentration in carpophores, naturally occurring **1** likely contributes little to the hallucinogenic effects of ingested magic mushrooms. *Psilocybe* mushrooms have been used as illicit hallucinogenic drugs. However, the value of their alkaloid natural products becomes evident when their pharmaceutical potential is also taken into account. Recent studies indicate a positive effect of psilocybin for treatment of, for example, addictions, chronic depressions, and anxiety disorders.^{17–19} Our work may add **1** to the candidates for further pharmaceutical development.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. The UV–vis spectrum of **1** was recorded by the diode-array detector during HPLC-MS experiments. Samples were dissolved in MeOH. The IR spectrum was recorded on a Jasco FT/IR 4100 instrument. To record 1D and 2D NMR spectra, the compound was dissolved in MeOH-*d*₄. ¹H and ¹³C chemical shifts were referenced relative to residual nondeuterated solvent traces at δ_{H} 3.34 ppm and δ_{C} 49.8 ppm, respectively. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 500 MHz spectrometer, at 300 K. Preparative HPLC was performed using an Agilent 1260 chromatograph equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C₈ column (250 × 21.2 mm, 7 μ m particle size). Semipreparative HPLC was done on an Agilent 1200 instrument equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C₈ column (250 × 9.4 mm, 5 μ m particle size). Analytical HPLC and mass spectrometry was performed on an Agilent 1260 chromatograph with a Zorbax Eclipse XDB C₁₈ column (150 × 4.6 mm, 3.5 μ m particle size), interfaced with an Agilent 6130 mass detector, and HRESIMS data were recorded on an Exactive Orbitrap instrument (Thermo Scientific). Chromatograms were recorded at λ = 280 nm; the respective diode array detectors covered the wavelength range of λ = 200–450 nm. Chemicals, solvents, and media components were purchased from Deutero, Sigma-Aldrich, Roth, and VWR.

Microbiological Methods. *Psilocybe cubensis* strains FSU12407 and FSU12410 were obtained from the Jena Microbial Resource Collection JMRC, and strain DSM-2530 was from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). All strains were maintained on malt extract/peptone (MEP) solid medium (30 g/L malt extract, 3 g/L soy peptone, 18 g/L agar, pH = 5.6) at T = 23 ± 1 °C in the dark. For carpophore production of strains FSU12407, FSU12410, and DSM-2530, 200 g of rye (dry weight) was inoculated with 10 mL of a homogenized liquid MEP culture. After 4–6 d, the rye culture was used to inoculate a bark humus/perlite mixture, filled in a plastic wrap-covered flower box, which was maintained at 23 ± 1 °C in the dark for 3 days. Subsequent exposure to light induced formation of carpophores, which were harvested before the velum was ruptured.

Comparative Extraction of *Psilocybe* Natural Products. To compare extraction methods, freshly harvested carpophores similar in size and equally mature were weighed, and equal masses extracted following three different procedures. Protocol 1: Carpophores were weighed, frozen in liquid nitrogen, lyophilized for 2 days, ground with mortar and pestle to a fine powder, and then extracted in 20 mL of anhydrous MeOH per gram fresh weight. Protocol 2: Carpophores were dried as in protocol 1 but extracted with a mixture of 20 mL of methanol–water (4:1, v/v) per gram fresh weight. Protocol 3: Carpophores were weighed and subsequently dried at T = 37 °C in an oven, for 2 days, then ground to a fine powder and extracted, as above,

in 20 mL of anhydrous MeOH per gram fresh weight. Protocol 4 was similar to protocol 1, but did not include lyophilization. Thus, water was not removed from the biomass.

Regardless of the protocol, the methanolic extracts were shaken at 140 rpm at RT for 18 h. A 100 μ L amount of each extract was filtered, and the solvent removed under reduced pressure. The residue was taken up in 100 μ L of water–acetonitrile (ACN) (9:1, v/v) and analyzed by LC/MS. To compare metabolite profiles, carpophores of strains FSU12407, FSU12410, and DSM-2530 were harvested, processed following protocol 1, and chromatographically analyzed.

Isolation of **1.** Mature *P. cubensis* carpophores FSU12407 (200 g) were frozen in liquid nitrogen, ground to a fine powder, which was extracted with 50 mL of MeOH, and supplemented with sodium dithionite (0.1 g/10 g biomass) to prevent extract oxidation. The extract was transferred to Erlenmeyer flasks, shaken at 140 rpm and 23 °C, for 18 h, and subsequently filtered. The solvent was removed under reduced pressure in a rotary evaporator. The dry mycelial extract was dissolved in a 1:1 (v/v) mixture of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water–cyclohexanol (20 mL of per 100 g biomass). The solution was centrifuged at 8800g for 10 min. Then, the aqueous phase was filtered and used for chromatographic separation. Preparative HPLC was carried out with solvents A (ACN) and B (0.1% (v/v) TFA in water) under isocratic conditions with 5% A and 95% B, at a flow rate of 20 mL/min, for 10 min. Fractions were dried under reduced pressure. The residue was dissolved in 0.1% TFA in water (1 mL per 10 mL initial volume of the fraction). Further purification was carried out by semipreparative HPLC that was performed with the above solvents. The column was eluted with a linear gradient of 5–15% A within 2 min, followed by an isocratic hold at 15% A for 13 min. The fractions containing **1** were combined, dried under reduced pressure, and stored at –20 °C. For NMR spectroscopy, the stored fractions were dissolved in 0.1% TFA in water and repurified by semipreparative HPLC as described above. ACN and H₂O were removed by brief rotary evaporation, followed by lyophilization. As **1** is air-sensitive, the compound was cooled, whenever possible, and stored under inert gas. Open handling was minimized. To record NMR spectra, the dry sample was immediately dissolved in 160 μ L of MeOH-*d*₄, transferred to an NMR tube, covered with nitrogen, and sealed.

Analytical HPLC and Mass Spectrometry. Solvent A was 0.1% TFA in ACN; solvent B was 0.1% TFA in water. The flow was 1 mL/min. A linear gradient from 5% to 30% A within 20 min was applied. Electrospray ionization was run in positive and negative mode, and the mass range of m/z 100–500 was scanned. For LC/HRESIMS, ionization was also in positive and negative mode, scanning the mass range of m/z 110–1000. Solvent A was ACN; solvent B was 0.1% (v/v) formic acid in water. The flow rate was 0.2 mL/min. A linear gradient from 5% to 98% A within 15 min was used.

Norpsilocin (1**):** amorphous, colorless solid; UV (H₂O–ACN, 4:1) λ_{max} (log ϵ) 3.00 (280 nm); IR (neat) 3370, 2477, 2244, 2072, 1674, 1204, 1119, 971 cm^{–1}; ¹H and ¹³C NMR data (MeOH-*d*₄, 500 and 125 MHz, respectively), see Table 1; HRESIMS m/z 191.1178 [M + H]⁺, calcd for C₁₁H₁₅N₂O 191.1179.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00407.

1D and 2D NMR spectra of norpsilocin (**1**) (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +49 3641 949850. Fax: +49 3641 949852. E-mail: dirk.hoffmeister@hki-jena.de.

ORCID

Dirk Hoffmeister: 0000-0002-5302-6461

Author Contributions

[†]C. Lenz and J. Wick contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, grant HO2515/7-1 to D.H.). We gratefully acknowledge A. Perner and H. Heinecke (Hans Knöll Institute, Jena) for recording high-resolution mass and NMR spectra, respectively. We thank E.-M. Jung (Friedrich-Schiller-Universität Jena) and Professor M. Nett (Technical University Dortmund) for assistance with fungal strains and inspection of the NMR data, respectively. C.L. acknowledges a doctoral fellowship by the International Leibniz Research School (ILRS Mibintact).

■ REFERENCES

- (1) Hofmann, A.; Heim, R.; Brack, A.; Kobel, H.; Frey, A.; Ott, H.; Petrzilka, T.; Troxler, F. *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 1557–1572.
- (2) Gartz, J. *J. Basic Microbiol.* **1994**, *34*, 17–22.
- (3) Wurst, M.; Kysilka, R.; Flieger, M. *Folia Microbiol. (Dordrecht, Neth.)* **2002**, *47*, 3–27.
- (4) Hasler, F.; Bourquin, D.; Brenneisen, R.; Bär, T.; Vollenweider, F. *X. Pharm. Acta Helv.* **1997**, *72*, 175–184.
- (5) Horita, A.; Weber, L. *J. Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 47–54.
- (6) Hasler, F.; Grimberg, U.; Benz, M. A.; Huber, T.; Vollenweider, F. *X. Psychopharmacol.* **2004**, *172*, 145–156.
- (7) Leung, A. Y.; Paul, A. G. *J. Pharm. Sci.* **1968**, *57*, 1667–1671.
- (8) Jensen, N.; Gartz, J.; Laatsch, H. *Planta Med.* **2006**, *72*, 665–666.
- (9) Troxler, F.; Seemann, F.; Hofmann, A. *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 2073–2103.
- (10) Agurell, S.; Nilsson, J. L. G. *Acta Chem. Scand.* **1968**, *22*, 1210–1218.
- (11) Fricke, J.; Blei, F.; Hoffmeister, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, DOI: 10.1002/anie.201705489.
- (12) White, P. C. *J. Chromatogr.* **1979**, *169*, 453–456.
- (13) Ametamey, S.; Vollenweider, F. X.; Patt, J.; Bourquin, D.; Hasler, F.; Beer, H.-F.; Schubiger, P. A. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1998**, *41*, 585–594.
- (14) Casale, J. F. *J. Forensic Sci.* **1985**, *30*, 247–250.
- (15) Borner, S.; Brenneisen, R. *J. Chromatogr.* **1987**, *408*, 402–408.
- (16) Gartz, J. *1991. Ann. Mus. Civ. Rovereto* **1991**, *7*, 265–274.
- (17) Carhart-Harris, R. L.; Bolstridge, M.; Rucker, J.; Day, C. M.; Erritzoe, D.; Kaelen, M.; Bloomfield, M.; Rickard, J. A.; Forbes, B.; Feilding, A.; Taylor, D.; Pilling, S.; Curran, V. H.; Nutt, D. *J. Lancet Psychiatry* **2016**, *3*, 619–627.
- (18) Grob, C. S.; Danforth, A. L.; Chopra, G. S.; Hagerty, M.; McKay, C. R.; Halberstadt, A. L.; Greer, G. R. *Arch. Gen. Psychiatry* **2011**, *68*, 71–78.
- (19) Bogenschütz, M. P.; Johnson, M. W. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2016**, *64*, 250–258.

1 Identification of ω -*N*-Methyl-4-hydroxytryptamine
2 (Norpsilocin) as a *Psilocybe* Natural Product

3 Claudius Lenz,[†] Jonas Wick,[†] and Dirk Hoffmeister^{*}

4 Department Pharmaceutical Microbiology at the Hans-Knöll-Institute, Friedrich-Schiller-
5 Universität Jena, Winzerlaer Strasse 2, 07745 Jena, Germany.

6

7

8

9

10

11

12 AUTHOR INFORMATION

13 **Corresponding Author**

14 *Phone: +49 3641 949850, Fax: +49 3641 949852, E-mail: dirk.hoffmeister@hki-jena.de

15 **Table of contents**

16	Figure S1. ^1H NMR spectrum of norpsilocin (1).	3
17	Figure S2. ^{13}C NMR spectrum of norpsilocin (1).	4
18	Figure S3. COSY spectrum of norpsilocin (1).	5
19	Figure S4. HSQC spectrum of norpsilocin (1).	6
20	Figure S5. HMBC spectrum of norpsilocin (1).	7

21

22

23

24

25

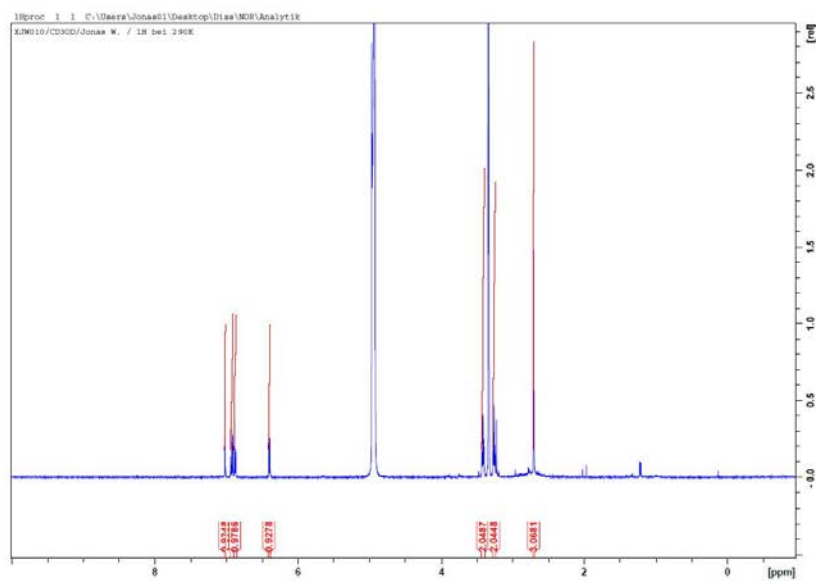
26

27

28

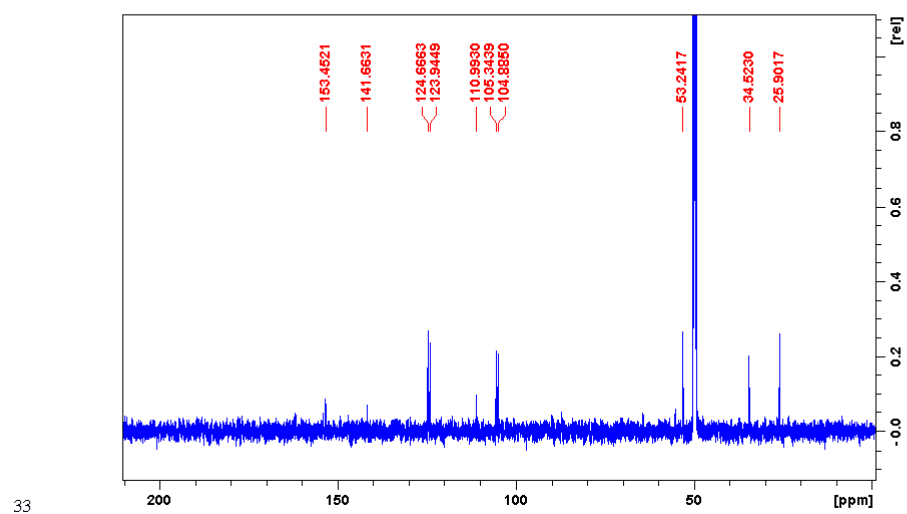
29

30

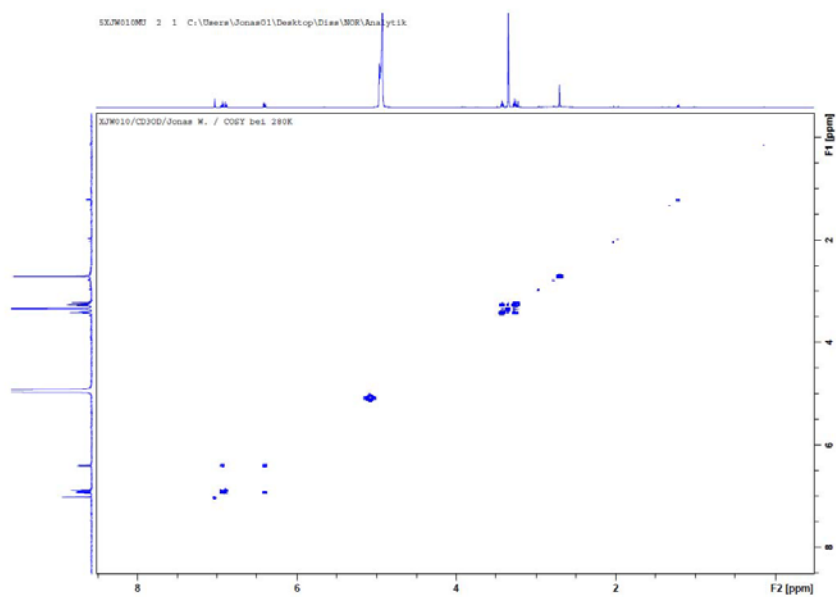


31

32 **Figure S1.** ^1H NMR spectrum of norpsilocin (**1**).

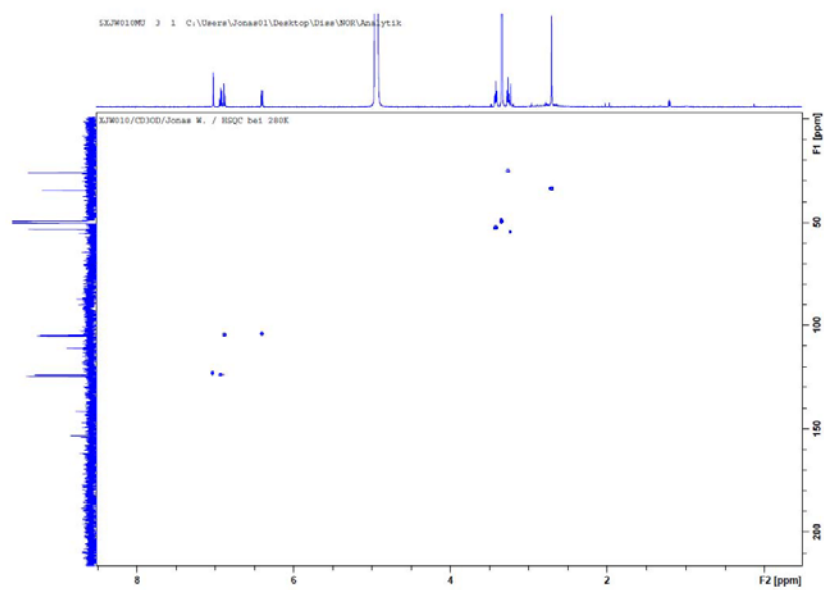


34 **Figure S2.** ^1H -decoupled ^{13}C NMR spectrum of norpsilocin (**1**).



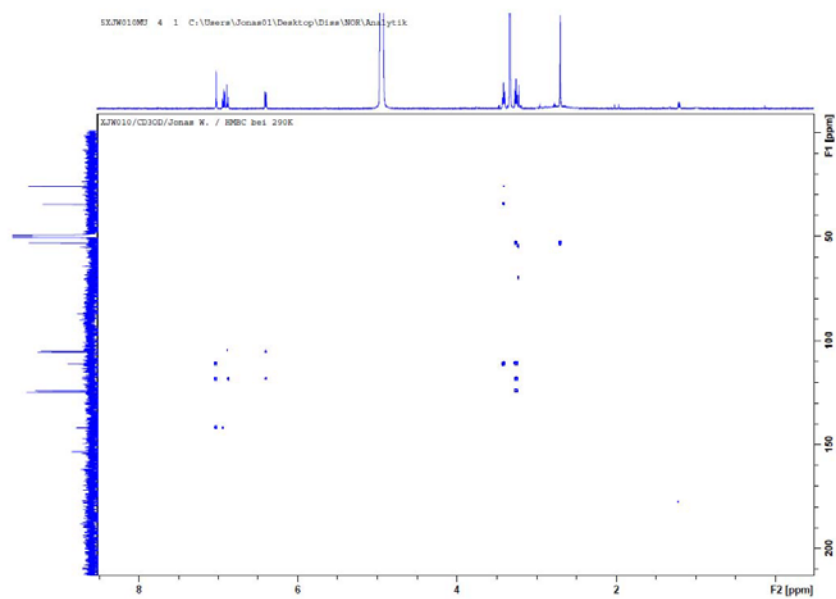
35

36 **Figure S3.** COSY spectrum of norpsilocin (**1**).



37

38 **Figure S4.** HSQC spectrum of norpsilocin (**1**).



39

40 **Figure S5.** HMBC spectrum of norpsilocin (**1**).

Production options for psilocybin – the making of the magic

Janis Fricke, Claudius Lenz, Jonas Wick, Felix Blei, Dirk Hoffmeister

Manuskript zur Publikation akzeptiert

Ein erneutes Interesse an Psilocybin als Medikament hat in jüngerer Vergangenheit zu zahlreichen Studien zur Therapie von Depressionen, Angststörungen und Suchterkrankungen geführt. Gegenwärtig werden in den Vereinigten Staaten von Amerika klinische Studien der Phase III geplant, welche die Sicherheit und Verträglichkeit von Psilocybin zur medikamentösen Anwendung untersuchen. Psilocybin wird von verschiedenen Basidiomyceten, vor allem aus der Gattung *Psilocybe*, gebildet. Die Anzucht und Extraktion solcher Pilze stellt somit eine Quelle für den Wirkstoff Psilocybin dar. Des Weiteren ermöglichen sowohl biotechnologische als auch chemische Synthesansätze die Produktion von Psilocybin, die in diesem Übersichtsartikel beleuchtet werden.

Angaben zum Eigenanteil von J. Wick (15 %):

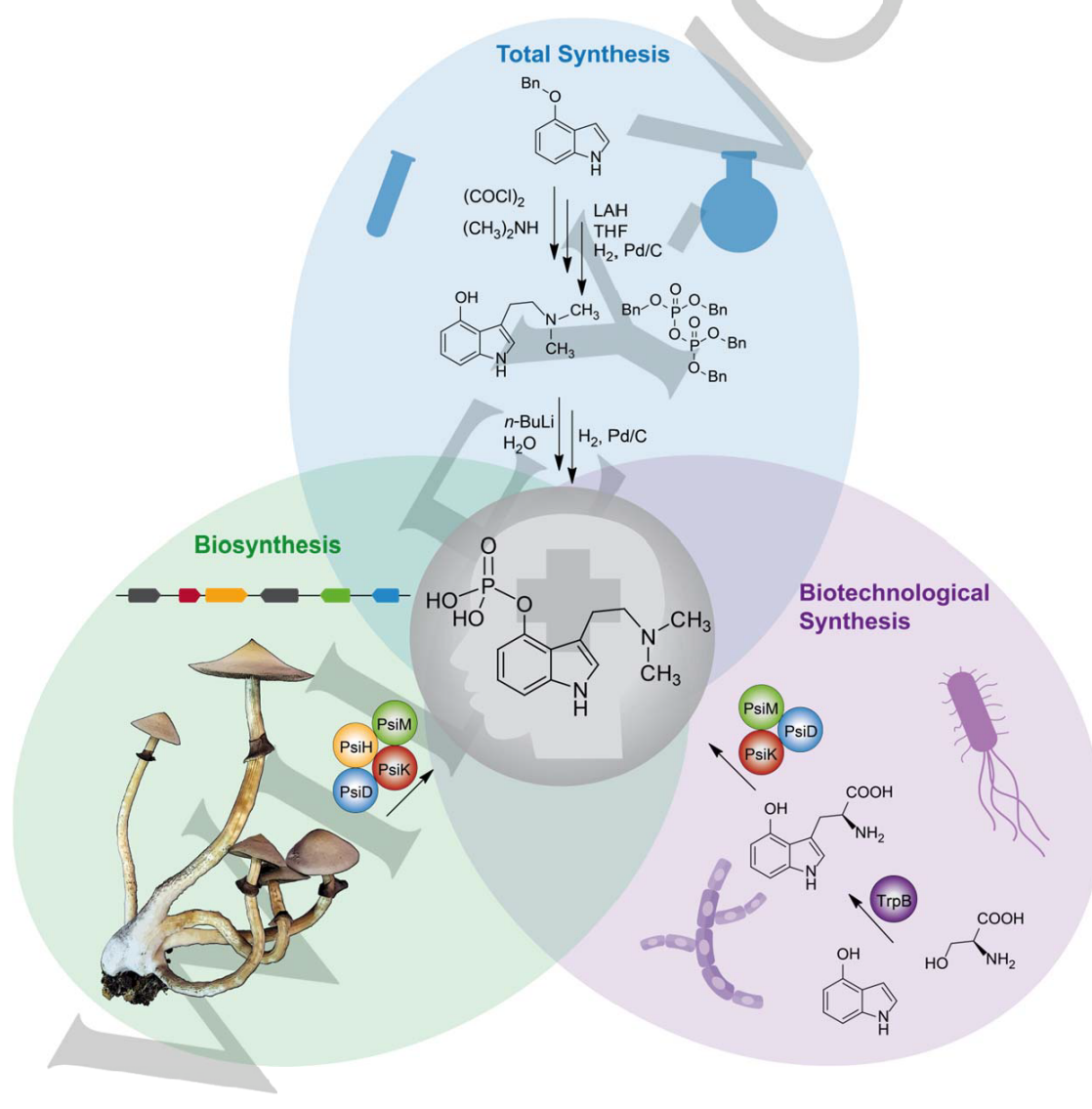
Beitrag zum Manuskripttext

Jena den

Prof. Dr. Dirk Hoffmeister

Production options for psilocybin – the making of the magic

Janis Fricke, Claudius Lenz, Jonas Wick, Felix Blei, and
and Dirk Hoffmeister^{*[a]}



Accepted Manuscript

CONCEPT

WILEY-VCH

Abstract: The fungal genus *Psilocybe* and other genera comprise numerous mushroom species that biosynthesize psilocybin (4-phosphoryloxy-*N,N*-dimethyltryptamine). It represents the prodrug to its dephosphorylated psychotropic analog, psilocin. The colloquial term "magic mushrooms" for these fungi alludes to their hallucinogenic effects and to their use as recreational drug. However, clinical trials have recognized psilocybin as a valuable candidate to be developed into a medication against depression and anxiety. We here highlight its recently elucidated biosynthesis, the concurrently developed concept of enzymatic *in vitro* and heterologous *in vivo* production, along with previous synthetic routes. The prospect of psilocybin as promising therapeutic may entail an increased demand which can be met by biotechnological production. Therefore, we briefly touch on psilocybin's therapeutic relevance and pharmacology as well.

Introduction

For decades, pharmaceutical chemistry has recognized microbial natural products as a valuable source for new drugs or drug leads.^[1] Research was primarily driven by the quest for new anti-infectives or anticancer compounds. Fungal metabolites have also served as immunosuppressants and lipid-lowering agents.^[2] Depression and cancer-related anxiety have surely not been among the conditions that would readily be associated with a fungal product as promising treatment option. However, psilocybin (4-phosphoryloxy-*N,N*-dimethyltryptamine, **1**, Figure 1), currently entering phase III clinical trials, is exactly that.^[3] It is the major metabolite of the hallucinogenic so-called magic mushrooms and undoubtedly represents one of the most prominent natural products. We present the recently characterized biosynthesis enzymes of **1** and the concept of its biotechnological production *in vitro* and in a heterologous system *in vivo*. We also review synthetic routes to **1** and include a view back on the history of **1** and ahead to its future as a valuable therapeutic.

Spotlights on psilocybin's history

"The first thing which they ate at the gathering was small, dark mushrooms (...). These are inebriating and induce visions to be seen and even provoke sensuousness."

Bernardino de Sahagún (1499-1590)

In his eminent *Historia general de las cosas de la Nueva Espana* (General History of the Things of New Spain), the Franciscan friar Bernardino de Sahagún provided an extraordinary ethnographic account on the indigenous

peoples of today's Mexico, on their culture and their ceremonies. His report also documents the phenomenal pharmacological effects of psychotropic and hallucinogenic tryptamine-like alkaloids: psilocin (4-hydroxy-*N,N*-dimethyltryptamine, **2**, Figure 1) is the actual psychotropic principle and instable dephosphorylated follow-up product of **1**, which is more stable and the biosynthetically made metabolite. Minor mushroom alkaloids include norbaeocystin (**3**), baecocystin (**4**), norpsilocin (**5**), and the quaternary ammonium salt of **1**, aeruginascin (**6**) as non-, mono-, or trimethylated congeners.^[4]



Figure 1. Chemical structures of psilocybin and related alkaloids from *Psilocybe* species and other "magic mushrooms".

Botanist Richard E. Schultes (1915-2001) investigated the lost and misinterpreted identity of the "plant" that caused the effects described in the ancient reports from Central America^[5] and associated mushrooms of the genus *Panaeolus* (which includes **1** producing species) with the reports. Ethnomycologist R. Gordon Wasson (1898-1986) and his wife Valentina (1901-1958) collected specimens and had the opportunity to participate in a mushroom ritual of native Mexicans. The fungi were identified by mycologist Roger Heim (1900-1979) as members of the genera *Stropharia*, *Conocybe*, and *Psilocybe*.^[6] He also provided chemist Albert Hofmann (1906-2008) at Sandoz Laboratories with *Psilocybe mexicana* fruiting bodies who succeeded in isolating **1** and **2** and in elucidating their structures.^[4a-d] Subsequently, close to 200 species, in the above genera and in *Gymnopilus*, *Pluteus*, and *Inocybe* species, have been confirmed as **1** producers. The **1** content depends on the extraction and work-up method, as it may decompose to **2**.^[4e] Reported values typically range between 0.85 % of the dry mass for *Psilocybe serbica*, ca. 1.0 % for *P. semilanceata*, and around 1.5-1.8 % in *P. azurescens*.^[7]

Structurally, these alkaloids are fairly simple and achiral, and closely related to the neurotransmitter serotonin (5-hydroxytryptamine). **1** has a molecular mass of *m/z* 284.1 (C₁₂H₁₇N₂O₄P), yet it uniquely combines two structural elements that are - each in itself - unusual. Firstly, a 4-hydroxyindole moiety is a very rare and distinctive structural feature among natural products. Secondly, **1** (and **3**, **4**, and **6** alike) features a phosphate ester, which is comparatively rare with natural products, too, though frequently found in energy metabolism and cellular signaling.

[a] J. Fricke, C. Lenz, J. Wick, F. Blei, Prof. Dr. D. Hoffmeister
Department Pharmaceutical Microbiology at the Hans-Knöll-Institute
Friedrich-Schiller-Universität
Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena (Germany)
E-mail: dirk.hoffmeister@leibniz-hki.de

CONCEPT

WILEY-VCH

The pharmacology of psilocybin

A closer look at the pharmacology of **1** clarifies the reason behind the "magic" (i.e., the hallucinogenic effects) of the above fungi (Figure 2): after ingestion, cleavage of the phosphate ester occurs which converts the prodrug **1** into **2**.^[7c] The latter compound interferes with serotonergic neurotransmission as it agonistically acts on 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{2A} and 5-HT_{2C} receptors ($K_i = 6$ nM for the 5-HT_{2A} receptor) and, to a lesser extent, on 5-HT_{1A} receptors of the human nervous system.^[7c, 8] The threshold dose for **1** is about 5 mg, uptake of 12–20 mg *per os* causes an altered state of consciousness.^[8] A lethal dose can only be estimated theoretically.^[7c] Somatic effects include dilated pupils, altered heart rate and blood pressure, among others. The perceptual effects become manifest in an altered sense of time (it appears to be virtually standing still), synaesthesiae, and visual hallucinations, such as fractals and multi-colored geometric objects.^[7c, 8a] Notable psychic effects are enhanced introspect, decreased depression, and mystical experiences, which is why native Central Americans considered these mushrooms divine and referred to them as "Flesh of the Gods".

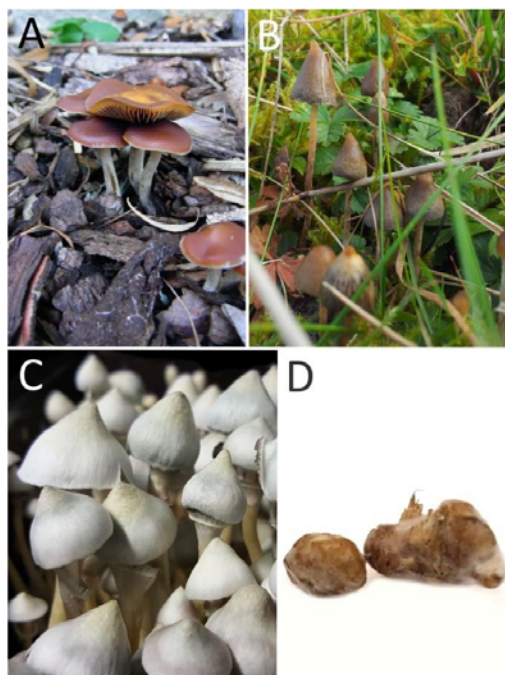


Figure 2. Mature fruiting bodies of the **1** producer *P. cubensis* (A) and *P. semilanceata* (B). Cultivated mushrooms of an unpigmented *P. cubensis* strain (C). **1** containing *Psilocybe sclerotia* (i.e., resilient fungal structures that withstand unfavorable environmental conditions, D).

How mushrooms make psilocybin

The historically earliest and still popular - albeit now illicit - way for humans to have access to **1** is to ingest the

producing organism, i.e., to use its biosynthetic capacity - but what is the mushroom's way to produce **1**?

Its origin from L-tryptophan (**8**) was established early on.^[9] Today's knowledge on its biosynthesis roots in seminal work by pharmaceutical chemists Stig Agurell (1932–2018) and J. Lars Nilsson (1938–2014). They synthesized various ¹⁴C and ³H radiolabeled presumed precursors, fed them to fungal mycelium, and traced incorporation into **1**. These authors proposed a five-step biosynthesis beginning with **8** that successively undergoes decarboxylation to tryptamine (**9**), repeated methylation to *N,N*-dimethyltryptamine (**10**), 4-hydroxylation to yield **2**, and 4-O-phosphorylation that leads to **1** formation (Scheme 1).^[10] From their results, these authors also hypothesized that alternative pathways to **1** may exist.

Half a century later, genomics greatly helped advance our understanding of the biosynthetic events. The genome sequences of various **1** producing species, including *P. cubensis*, a European isolate of the wider *P. cyanescens* species complex (*P. serbica*), a North American strain of *P. cyanescens sensu stricto*, *Panaeolus cyanescens*, and *Gymnopilus dilepis* were reported.^[11] These species share a set of genes in an about 11–22 kb portion of their genomes that encodes four biosynthesis enzymes along with transporters (Figure 3). Heterologous production of the putative decarboxylase PsiD, the kinase PsiK, and the methyltransferase PsiM in *Escherichia coli* and *in vitro* activity assays were performed. *Aspergillus niger* was used for *in vivo* characterization of PsiH, a putative P₄₅₀ monooxygenase. The activities found confirmed the hypothesis of these enzymes catalyzing **1** formation. Concurrently, the substrate specificity profiles revealed unexpected results regarding the order of biosynthetic events and the emerging option on biotechnological **1** production.

PsiD catalyzes decarboxylation of **8** into **9** as initial step but is not strictly specific as it also decarboxylates 4-hydroxy-L-tryptophan (**12**) as well, which turned out advantageous for *in vitro* production of **1**. Curiously, PsiD is entirely unrelated to known fungal and plant aromatic L-amino acid decarboxylases. Rather, it belongs to the family of PLP-independent phosphatidylserine decarboxylases.^[11a]

PsiH is a P₄₅₀ monooxygenase that selectively hydroxylates the position 4 of **9** to produce 4-hydroxytryptamine (**13**) as second biosynthetic step (Scheme 1).^[11a]

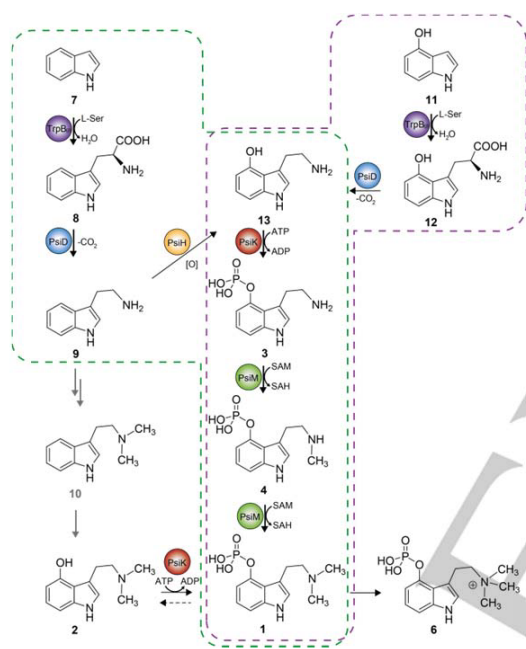
PsiK catalyzes the subsequent phosphotransfer step onto **13** to yield **3**. Opposite to the previous view, **2** is not the precursor of **1**, but serves as a PsiK substrate as well. The reason and biosynthetic implications need to be viewed in the context of the methyltransferase PsiM.^[11a]

The PsiM-catalyzed methyltransfer steps convert **3** via **4** to **1** which concludes the biosynthesis.^[11a] The specificity of PsiM is remarkable. Aside from mere product traces of **5**, detected with **13** as methyl acceptor,^[4a] PsiM seems to require a 4-O-phosphoryloxy group for proper substrate recognition.

CONCEPT

WILEY-VCH

The above enzyme characteristics imply that neither **2** nor **10** is a pathway intermediate: PsiM's tight specificity excludes **10** formation (which would precede **2** by only one step and become biosynthesized through hydroxylation by the substrate-flexible PsiH). Further, if **2** occurs, e.g., by intracellular dephosphorylation, it is rephosphorylated by PsiK and converted to **1**. In other words, the pathway is designed to prevent, rather than support, **2** formation. Still, **2** has been reported from *Psilocybe* species,^[7c] yet the reported quantities represent an artefact generated during work-up.^[4e]



Scheme 1. Biosynthesis of **1**. The green dashed frame indicates the cellular biosynthesis, the purple frame the enzymatic synthesis *in vitro*, beginning from 4-hydroxyindole (**11**) or **12**. Grey arrows (left) symbolize the biosynthetic pathway initially proposed by Agurell and Nilsson^[10] who also assumed alternative routes toward **1**. Aerginascins (**6**) has only been described from *Inocybe aeruginascens*, not from *Psilocybe* species.

The identification of the biosynthetic enzymes toward **1** laid the foundation for its biotechnological synthesis, for which two different routes can be envisioned. The first option includes the enzymatic synthesis *in vitro*, while the alternative route involves reconstitution of the pathway *in vivo* by introducing the biosynthesis genes into a suitable host.

Enzymatic production *in vitro*

As indicated above, PsiD accepts **12** as substrate. This substrate was used to initiate the *in vitro* process. Consequently, PsiH-catalyzed hydroxylation was eliminated

which helped reduce the number of steps and, hence, the number of involved enzymes. Otherwise, the procedure would have required a compatible P₄₅₀ reductase as redox partner to supply the monooxygenase with electrons. As proof of concept and without any further optimization, in a PsiD/PsiK/PsiM one-pot reaction (Scheme 1), amended with the respective co-substrates, 15 μmol of **12** were turned over into 3.9 μmol of **1**.^[11a] Minor amounts of precursors **3** and **4** were present after the reaction as well. For the first time, **1** was obtained neither from a mushroom nor synthetically.

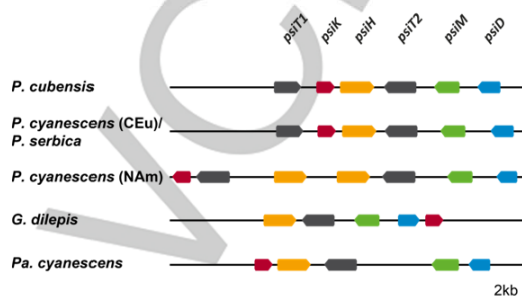


Figure 3. Genetic loci encoding enzymes for **1** biosynthesis in *Psilocybe cubensis*, a Central European (CEu) isolate of the *P. cyanescens* species complex (*P. serbica*); a North American (NAM) isolate of *P. cyanescens* sensu stricto, *Gymnopilus dilepis*, and *Panaeolus cyanescens*. The genes *psiK* (red) and *psiH* (gold) code for the kinase and the tryptamine monooxygenase, respectively, which modify the indole core. The genes *psiM* (green) and *psiD* (blue) code for the methyltransferase and the L-tryptophan decarboxylase, respectively, which initiate and conclude **1** biosynthesis. Putative transporter genes (e.g., *psiT1* and *psiT2*) in *P. cubensis* are shown in dark grey. Only **1** biosynthesis and transport genes are shown.

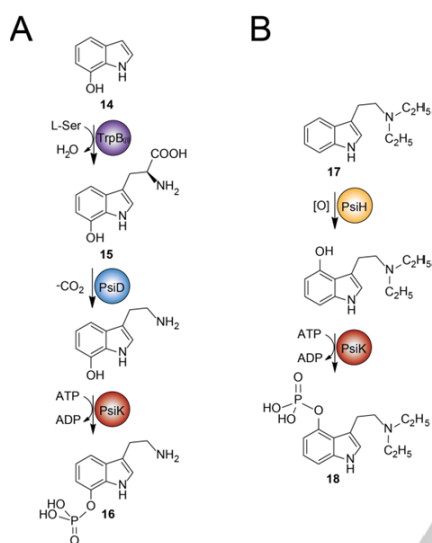
Very recently, this procedure was extended, making use of the flexibility of the *P. cubensis* tryptophan synthase TrpB.^[12] In fungi, tryptophan synthases are α/β-homodimers and catalyze the penultimate and terminal step of **8** biosynthesis, which is the cleavage of 1-(indole-3-yl)glycerol phosphate in the first half reaction by the α-subunit to release indole (**7**) for the second half reaction.^[13] The latter is catalyzed by the β-subunit and condenses **7** and L-serine into **8**. Precedence for flexible tryptophan synthases stems from bacterial representatives. Specifically, their β-subunits were useful to generate halogenated tryptophan derivatives by offering the respective substituted indoles as substrate, while β-methylated tryptophan was produced when L-threonine replaced L-serine.^[14] *P. cubensis* TrpB is the first characterized mushroom tryptophan synthase and turned out flexible for substituted indoles as well. Particularly, it accepted 4-hydroxyindole (**11**) which allowed for its integration into **1** production (Scheme 1). In a four-enzyme, one-pot reaction, **12** was produced by TrpB from L-serine and **11** as inexpensive building blocks and further converted by PsiD, PsiK, and PsiM into **1**.^[12] About 20% of the added **11** was converted into **1**.

CONCEPT

WILEY-VCH

Enzymatic production of psilocybin congeners

Intriguingly, *P. cubensis* TrpB accepted 7-hydroxyindole (**14**) as substrate as well and, consequently, produced 7-hydroxy-L-tryptophan (**15**) *in vitro*. The combined TrpB/PsiD/PsiK/PsiM assay led to formation of the new **1** congener isonorbacocystin (**16**, 7-phosphoryloxytryptamine, Scheme 2), demonstrating that PsiD and PsiK were cooperative and accepted the respective intermediates.^[12]



Scheme 2. A) *In vitro* enzymatic pathway to isonorbacocystin (**16**);^[12] B) Biotransformation of *N,N*-diethyltryptamine (**17**) into 4-phosphoryloxy-*N,N*-diethyltryptamine (**18**) by *P. cubensis*.^[15] The catalysis by PsiH and PsiK has not been proven yet but is likely.

However, **16** was not methylated into the respective isomer of **1**. This is consistent with the previously observed specificity of the methyltransferase PsiM. As a perspective to further develop the concept of facile *in vitro* production of **1** derivatives, future work may focus on directed evolution or site-specific engineering of *P. cubensis* PsiM to eliminate its gatekeeper role against **2** formation by relaxing its specificity. An earlier approach included biotransformation of *N*-alkyltryptamines, fed to fungal mycelia.^[15] E.g., *N,N*-diethyltryptamine (**17**) was hydroxylated and phosphorylated to 4-phosphoryloxy-*N,N*-diethyltryptamine (**18**) by *P. cubensis* (Scheme 2). This result adds to the notion of the flexible PsiH/PsiK pair of enzymes which represent the most plausible candidates to have catalyzed this biotransformation.

Heterologous *in vivo* production

Detailed knowledge on **1** biosynthesis paved the way to genetically engineer a naïve microbial host for heterologous *in vivo* production. As a reliable and robust model organism, the mold *Aspergillus nidulans* was chosen.^[16] To reconstitute

the biosynthesis, all four biosynthesis genes needed to be inserted into the host genome. Further, concerted gene expression was critical. Briefly, a tetracyclin-inducible gene expression system (the so-called Tet-On cassette) was harnessed and combined with an advanced approach to produce the biosynthesis enzymes from a single transcript as a polycistron (i.e., expressing multiple genes as one mRNA molecule, which is still translated into discrete enzymes). In standard small-volume Erlenmeyer shake flasks and without further optimization of culture conditions and media, **1** was accumulating in the biomass, and titers reached >100 mg/L.^[16]

Synthetic routes toward psilocybin

Along with related tryptamines, **1** has first been prepared chemically in the 1950's by Hofmann and coworkers.^[4c,17] Since then, a couple of advances have been published (Scheme 3).

Traditionally, benzyl-protected 4-hydroxyindole (**19a**) is treated with first oxalyl chloride and subsequently dimethylamine, leading to a dimethylaminooxalyl side chain in the 3-position of the 7 nucleus (compound **20a**, Scheme 3A). This step is followed by LiAlH₄ reduction to **21** and finally deprotection to give **2**. Later, Hofmann's procedure^[4c] was optimized (66% overall yields to **2**) by Nichols and Frescas.^[18] In addition, Shirota et al.^[19] replaced **19a** by **19b**, to consolidate reduction and deprotection of the intermediate **20b** into a single step (Scheme 3, dashed arrow).

An alternative approach to build the side chain was published utilizing indole-3-carbaldehyde for nucleophilic installation of a nitrile function, which is then reduced and dimethylated.^[20] Due to excessive use of toxic reagents (thallium salt, cyanides) and low overall economy, this strategy can be considered little appropriate for large scale synthesis.

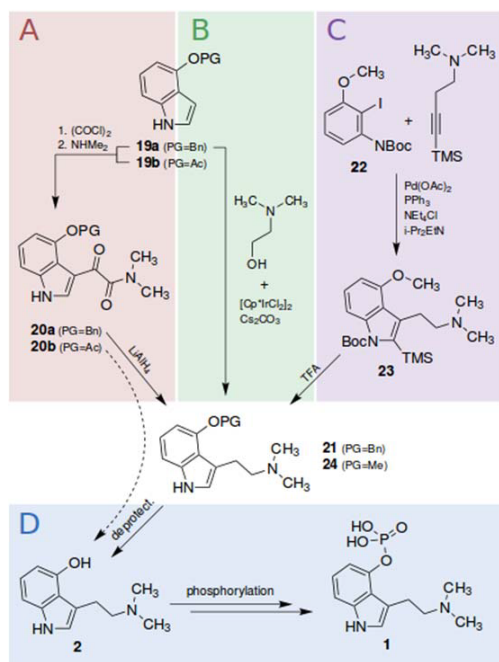
The most recent contribution in the field (Scheme 3B) appears convincing regarding its simplicity, it is atom- and step-economic, and does not produce major quantities of toxic waste. Yields were comparable to the traditional route (61% overall to **2**).^[21] Bartolucci et al. succeeded in attaching the pre-tailored side chain in one step via an iridium-catalyzed borrowing hydrogen procedure to the desired position, giving formally only water as a byproduct.^[21]

Beyond these methods, **2** was synthesized by reacting *ortho*-iodoanilin (**22**) derivatives with suitable unsaturated precursors.^[22,23] Through this route, the indole core is formed directly utilizing Pd-catalysis (Scheme 3C). While some of these methods still require subsequent multi-step modifications on the sidechain,^[22] Gathergood and Scammells accomplished this route via **23** and **24** with the final side chain generated prior to the indole ring formation (Scheme 3C).^[23] The yield from **22** to **2** was 24%.

Synthesis of **1** is completed by phosphate-esterification of **2** (Scheme 3D). This terminal conversion has not received yet

CONCEPT

as much attention as the other steps, perhaps as **2** represents the actual bioactive compound, and synthesis of **1** requires additional steps. However, the synthesis of **1** as a less redox-sensitive but biocompatible storage form of the active alkaloid has likely been evolved in the biosynthesis to stabilize the fungal product and could serve the same purpose for the pharmaceutical chemist. To date, the most convenient phosphorylation of **2** uses *n*-BuLi and tetrabenzylidiphosphate followed by deprotection via Pd-catalyzed hydrogenation,^[19] leading to **1** in acceptable yields (72 % from **2**).



Scheme 3. Synthetic routes toward **2** and **1**.

Presently, the demand for **1** for pharmaceutical purposes, i.e., produced under cGMP conditions for clinical studies, is met by organic synthesis. Currently, costs to synthesize one gram of **1** for phase III clinical studies, based on Hofmann's protocol, is estimated to be greater than US\$ 2,000.

Yet, *in vitro* biotechnologically produced compound represents an attractive alternative. Cultures of an engineered fungal microorganism producing **1** can be relatively easily scaled up and grown in large fermenters. Compared with whole-cell catalysis, *in vitro* catalysis with isolated enzymes is usually advantageous for compound work-up due to a lower background. However, efforts to produce and purify the enzymes need to be taken in account, as well as enzyme stability, solubility, and supply of co-substrates (which in the case of whole-cell catalysis are provided by the host cells). Specific to P_{450} enzymes, electron transfer partners need to be included in an *in vitro* approach.

WILEY-VCH

Concluding remarks - psilocybin as a future therapeutic

The reason to produce - biotechnologically, synthetically, or biosynthetically - a psychotropic compound stems from its (re)discovered therapeutic value. The pharmaceutical usefulness of **1** was recognized soon after its discovery. Initially, synthetic **1** was distributed under the trade name Indocybin Sandoz for psychotherapeutic purposes.^[8a] Meanwhile, its pharmacology earned **1** both a cult and a stigma. The mushrooms soon developed into a popular recreational drug. Prohibition began in the early 1970s, when **1** became a Schedule I compound, according to the UN convention on Drugs and similar national legislation in numerous countries.^[24] Being legally categorized as a highly addictive drug without medicinal usefulness, research on **1** was essentially abandoned.

Not until one generation of scholars later, research picked up momentum again. The renewed interest in **1** as prodrug of the therapeutic agent **2** was accompanied by studies on its relative physiological and psychological safety in controlled and well-defined settings.^[25] The studies showed promising outcomes in the therapy of cancer-related psychiatric distress and anxiety, treatment-resistant depression, and substance addiction.^[26] However, a commonly acknowledged drawback of these studies is the low number of participants due to administrative barriers.^[27] With the aim of FDA registration for **1** as a medication for psychological distress, phase III studies are currently being planned.^[3] US-based non-profit organizations, such as the Usona Institute in Madison, WI, and the Heffter Research Institute support and promote research into the future clinical use of **1**, based on highest clinical standards. These initiatives leave us with a cautiously optimistic perspective that **1** may return into pharmaceutical use in the not-too-far future.

Acknowledgments

We are grateful to Robert Kargbo (Usona Institute, Madison, WI) for valuable comments on the manuscript. C.L. acknowledges a doctoral fellowship by the International Leibniz Research School (ILRS) for Microbial Interactions. Work in D.H.'s laboratory on psilocybin biosynthesis is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG (grant HO2515/7-1). D.H. is also supported by the Collaborative Research Center ChemBioSys (grant SFB1127) and by the excellence graduate school Jena School for Microbial Communication (JSMC).

Keywords: biosynthesis • biotechnology • depression • natural products • psilocybin

- [1] D.J. Newman, G.M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629-661.
- [2] M. Misiek, D. Hoffmeister, *Planta Med.* **2007**, *73*, 103-115.
- [3] A.M. Sherwood, T.E. Prisinzano, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2018**, *11*, 1-3.
- [4] a) A. Hofmann, R. Heim, A. Brack, H. Kobel, *Experientia* **1958**, *14*, 107-109; b) A. Hofmann, A. Frey, H. Ott, T. Petzlikka, F. Troxler, *Experientia* **1958**, *14*, 397-399; c) A. Hofmann, R. Heim, A. Brack, H. Kobel, A. Frey, H. Ott, T. Petzlikka, F. Troxler, *Helv. Chim. Acta*

- 1959, 42, 1557-1572; d) A.Y. Leung, A.G. Paul, *J. Pharm. Sci.* **1968**, 57, 1667-1671; e) C. Lenz, J. Wick, D. Hoffmeister, *J. Nat. Prod.* **2017**, 80, 2835-2838; f) N. Jensen, J. Gartz, H. Laatsch, *Planta Med.* **2006**, 72, 665-666.
- [5] R.E. Schultes, *Amer. Anthropol.* **1958** 14, 429-443.
- [6] V.P. Wasson, R.G. Wasson, *Mushrooms Russia and History*, Vol. II, Pantheon Books, New York **1996**.
- [7] a) J. Gartz, *J. Bas. Microbiol.* **1994**, 34, 17-22; b) J. Gartz, *Ann. Mus. Civ. Rovereto* **1994**, 10, 297-305; c) F. Tyls, T. Palenicek, J. Horacek, *Europ. Neuropsychopharm.* **2014**, 24, 342-356.
- [8] a) T. Passie, J. Selfert, U. Schneider, H. M. Emrich, *Addict. Biol.* **2002**, 7, 357-364; b) D.J. McKenna, D.B. Repke, S.J. Peroulka, *Neuropsychopharmacology*, **1990**, 9, 193-198.
- [9] A. Brack, A. Hofmann, F. Kalberer, H. Kobel, J. Rutschmann, *Arch. Pharm.* **1961**, 294, 230-234.
- [10] a) S. Agurell, J.L. Nilsson, *Acta Chem. Scand.* **1968**, 22, 1210-1218; b) S. Agurell, J.L. Nilsson, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 9, 1063-1064.
- [11] a) J. Fricke, F. Blei, D. Hoffmeister, *Angew. Chem. Intl. Ed.* **2017**, 56, 12352-12355; b) H.T. Reynolds, V. Vijayakumar, E. Gluck-Thaler, H.B. Korotkin, P.B. Matheny, J.C. Slot, *Evol. Lett.* (doi: 10.1002/evl3.42).
- [12] F. Blei, F. Baldeweg, J. Fricke, D. Hoffmeister, *Chem. Eur. J.* **2018**, (accepted).
- [13] a) W. Duntze, T.R. Manney, *J. Bacteriol.* **1968**, 96, 2085-2093; b) H. Zalkin, C. Yanofsky, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 1491-1500; c) C. Skrzynia, D.M. Binninger, J.A. Alspaugh, P.J. Pukkila, *Gene* **1989**, 81, 73-82; M.F. Dunn, D. Nils, H. Ngo, T.R. Barends, I. Schlichting, *Trends Biochem. Sci.* **2008**, 33, 254-264.
- [14] a) R.J. Goss, P.L. Newill, *Chem. Commun.* **2006**, 47, 4924-4925; b) D.R. Smith, T. Willemse, D.S. Gkotsi, W. Schepens, B.U. Maes, S. Ballet, R.J. Goss, *Org. Lett.* **2014**, 16, 2622-2625; c) D. Francis, M. Winn, J. Latham, M.F. Greaney, J. Micklefield, *ChemBioChem* **2017**, 18, 382-386; d) M. Herger, P. van Roye, D.K. Romney, S. Brinkmann-Chen, A.R. Buller, F.H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 8388-8391.
- [15] J. Gartz, *J. Bas. Microbiol.* **1989**, 29, 347-352.
- [16] S. Hoefgen, J. Lin, J. Fricke, M. Stroe, D.J. Mattern, J.E. Kufs, P. Hortschansky, A.A. Brakhage, D. Hoffmeister, V. Valiante, *Metab. Eng.* **2018**, 48, 44-51.
- [17] a) A. Stoll, F. Troxler, J. Peyer, A. Hofmann, *Helv. Chim. Acta.* **1955**, 38, 1452-1472; b) F. Troxler, F. Seemann, A. Hofmann *Helv. Chim. Acta.* **1959**, 42, 2073-2103.
- [18] D.E. Nichols, S. Frescas, *Synthesis* **1999**, 6, 935-938.
- [19] O. Shirota, W. Hakamata, Y. Goda, *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 885-887.
- [20] F. Yamada, M. Tamura, M. Somei, *Heterocycles* **1998**, 49, 451-457.
- [21] S. Bartolucci, M. Mari, G. Di Gregorio, G. Piersanti, *Tetrahedron* **2016**, 72, 2233-2238.
- [22] a) H. Sakagami, K. Ogasawara, *Heterocycles* **1999**, 51, 1131-1135; b) C. Hu, H. Qin, Y. Cui, Y. Jia, *Tetrahedron* **2009**, 65, 9075-9080.
- [23] N. Gathergood, P.J. Scammells, *Org. Lett.* **2003**, 5, 921-923.
- [24] J.J.H. Rucker, J. Iliff, D.J. Nutt, *Neuropharmacology* **2017**, pii: S0028-3908(17)30638-X.
- [25] a) F. Hasler, U. Grimberg, M.A. Benz, T. Huber, F.X. Vollenweider, *Psychopharmacol.* **2004**, 172, 145-156; b) M.W. Johnson, W.A. Richards, R.R. Griffiths, *J. Psychopharmacol.* **2008**, 22, 603-620; c) D.J. Nutt, L.A. King, L.D. Phillips, Independent Scientific Committee on Drugs, *Lancet*, **2010**, 376, 1558-1565.
- [26] M.W. Johnson, R.R. Griffiths, *Neurotherapeutics* **2017**, 14, 734-740.
- [27] D.J. Nutt, L.A. King, D.E. Nichols, *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, 14, 577-585.

Iterative L-tryptophan methylation in *Psilocybe* evolved by subdomain duplication

Felix Blei, Janis Fricke, Jonas Wick, Jason C. Slot, Dirk Hoffmeister

Manuskript zur Publikation akzeptiert

Neben dem psychotropen tryptophanabgeleiteten Indolalkaloid Psilocybin konnten in Extrakten von *Psilocybe serbica* auch die tryptophanabgeleiteten Stoffe *N*-methyl-L-tryptophan und *N,N*-dimethyl-L-tryptophan nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Stoffe nicht Zwischenstufen der Psilocybin-Biosynthese sein können. Vielmehr stellen sie Zwischenprodukte der *N,N,N*,-trimethyl-L-tryptophan (L-Hypaphorin) -synthese dar. Die Reaktion katalysierende Methyltransferase TrpM wurde charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass PsiM2 phylogenetisch nicht mit der an der Biosynthese des Psilocybins beteiligten Methyltransferase PsiM verwandt ist.

Angaben zum Eigenanteil von J. Wick (15 %):

Extraktion und Analytik (HPLC-HRMS) der Extrakte aus *Psilocybe*.

Jena den

Prof. Dr. Dirk Hoffmeister

Iterative L-tryptophan methylation in *Psilocybe* evolved by sub-domain duplication

Felix Blei,^[a] Janis Fricke,^[a] Jonas Wick,^[a] Jason C. Slot,^{*,[b]} and Dirk Hoffmeister^{*,[a]}

Abstract: *Psilocybe* mushrooms are best known for their L-tryptophan-derived psychotropic alkaloid psilocybin. The dimethylation of its precursor norbaeocystin by the enzyme PsiM is a critical step during its biosynthesis. However, the “magic” mushroom *Psilocybe serbica* also mono- and dimethylates L-tryptophan, which is incompatible with the specificity of PsiM. Here, a second methyltransferase, TrpM, was identified and functionally characterized. Mono- and dimethylation activity on L-tryptophan was reconstituted *in vitro*, while tryptamine was rejected as substrate. Therefore, we describe a second L-tryptophan-dependent pathway in *Psilocybe* which is not part of the psilocybin biosynthesis. TrpM is unrelated to PsiM, but originates from a retained ancient duplication event of a portion of the *egtDB* gene which encodes an ergothioneine biosynthesis enzyme. During mushroom evolution, this duplicated gene was widely lost, but re-evolved sporadically and independently in various genera. We propose a new secondary metabolism evolvability mechanism, in which weakly selected genes are retained through preservation in a widely distributed, conserved pathway.

The fungal genus *Psilocybe* comprises numerous mushroom species that biosynthesize tryptamine alkaloids, primarily psilocybin (4-phosphoryloxy-*N,N*-dimethyltryptamine, **1**, Figure 1).^[1] It represents a prodrug to its dephosphorylated congener psilocin (**2**), which agonistically targets serotonin receptors in the central nervous system.^[2] The colloquial term “magic mushrooms” for these fungi alludes to their psychotropic effects and to their use as recreational drug. However, clinical trials have recognized **1** as a valuable candidate to be developed into a medication against cancer-related anxiety and treatment-resistant depression.^[3]

Relying on *Psilocybe cubensis*, *P. cyanescens*, and other species, evolutionary, ecological, and biochemical aspects of **1** biosynthesis have been investigated by our laboratories.^[4] Evolutionarily, **1** production has been advantageous to alter the behaviour of mycophagous and wood-inhabiting insects that share their habitat with the fungus. For its biosynthesis, L-tryptophan (**3**) is fed into a sequential four-step pathway, catalyzed by the decarboxylase PsiD, the P₄₅₀ monooxygenase

PsiH, the kinase PsiK, and the *N*-methyltransferase PsiM (Scheme 1). Importantly, The preference of PsiM for norbaeocystin (Figure 1), i.e., a substrate with a 4-phosphoryloxy group, places this enzyme at the end of the **1** biosynthetic cascade.^[4a,4c] However, during mass spectrometric analyses of *P. serbica* extracts, we surprisingly found signals that were consistent with the masses of L-abrine (=N- α -methyl-L-tryptophan, **4**) and *N,N*- α -dimethyl-L-tryptophan (**5**), respectively (Figure 2), which are known natural products, e.g., from the jequirity bean (*Abrus precatorius*).^[5] Since PsiM does not accept **3** as substrate, occurrence of **4** and **5** in *P. serbica* indicates a PsiM-independent methylation by an as yet unknown enzyme.

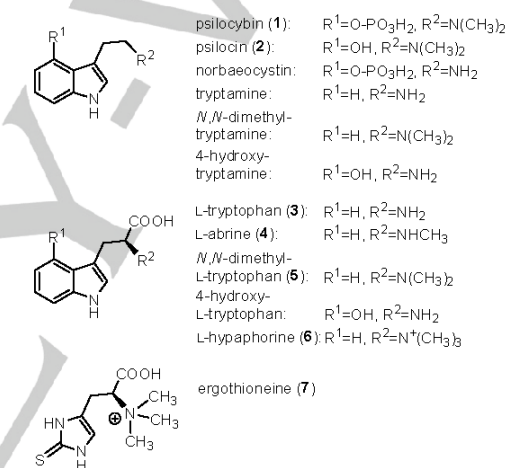


Figure 1. Structures of indole alkaloids isolated from *Psilocybe* and other fungal species, products of the methyltransferase TrpM, and of ergothioneine.

We here report on the functional and phylogenetic characterization of TrpM, an *S*-adenosyl-L-methionine (SAM)-dependent methyltransferase of *P. serbica*. This enzyme does not take part in **1** biosynthesis, but catalyzes a second pathway that originates from **3** and includes formation of a tertiary amine by iterative *N*-methylation.

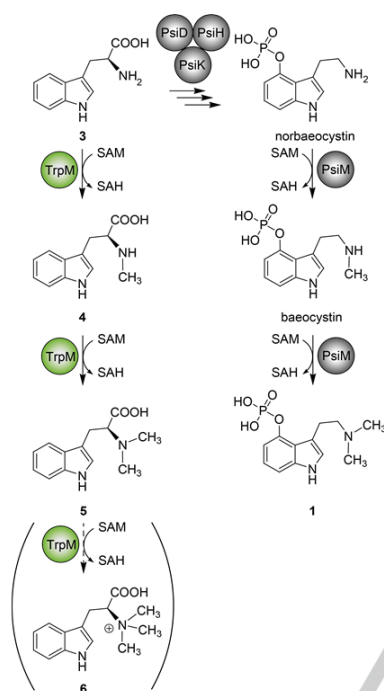
PsiM-independent **3** methylation in *Psilocybe* mushrooms appeared plausible, given the report on EgtD, a mycobacterial enzyme that features a MT₃₃ methyltransferase superfamily domain. EgtD is required for ergothioneine (**7**) biosynthesis and processively trimethylates L-histidine.^[6] **7** occurs in various fungi (and bacteria and plants alike) and is hypothesized to participate in cellular redox processes.^[6a] Specifically, crystallographic work and subsequent targeted active site engineering of EgtD (EgtD^{E282A,M252V}) to emulate a fungal active site converted this enzyme into a **3** methyltransferase. Combined with surveys on fungal genomic data, this finding suggested that mushrooms use

[a] F. Blei, J. Fricke, J. Wick, Prof. Dr. D. Hoffmeister
 Department Pharmaceutical Microbiology at the Hans Knöll Institute
 Friedrich-Schiller-Universität
 Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena (Germany)
 E-mail: dirk.hoffmeister@leibniz-hki.de

[b] Prof. Jason C. Slot, Ph.D.
 Department of Plant Pathology
 Ohio State University
 2021 Coffey Road
 Columbus, OH 43210 (USA)
 E-mail: slot.1@osu.edu

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document.

EgtD-like methyltransferases to produce L-hypaphorine (*N,N,N*- α -trimethyl-L-tryptophan, **6**, Figure 1).^[6a] This fungal product is ecologically relevant as an agonist of the phytohormone indole-3-acetic acid, which is e.g., secreted by the tree partner in ectomycorrhizal symbioses.^[7]



Scheme 1. Methyl transfer steps during biosynthetic pathways to **5** and **1** in *Psilocybe serbica*. The parentheses and the dashed arrow indicate low turnover to **6** by TrpM.

The genomic sequences of a North American *P. cyanescens* isolate is published, as well as a Central European isolate of *P. serbica* (which falls into *P. cyanescens* species complex in the wide sense).^[4] This sequence data was browsed for further genes encoding small molecule methyltransferases. In the European isolate (*P. serbica* FSU12416), two *egtD*-like genes were identified: one was fused to an *egtB* homolog, which is the expected gene for sulfoxide synthase required for putative **7** assembly. Fused *egtDB* genes for **7** biosynthesis are common in fungi. The second gene encoded a non-fusion methyltransferase, which we considered a candidate enzyme for **3** methylation. Standalone *egtD*-like genes rarely exist in basidiomycetes. Examples include HyoA,^[6a] a putative **6** synthase of the mushroom *Dichomitus squalens* which shares 37% identical amino acids, and a hypothetical protein of *Galerina marginata* (protein ID: KDR66884.1, 70% identical aa).

In *P. serbica* FSU12416, the 1237 bp long candidate gene *trpM* is disrupted by three introns, as predicted by Augustus software. The 1077 bp reading frame thus encodes a 358 aa protein with a calculated pI=5.1 and a mass of 39.6 kDa. Notably, *trpM* is not

encoded within the **1** biosynthesis gene cluster. Also, TrpM and PsiM are phylogenetically unrelated, as the former is a member of the methyltransferase family 33 whereas the latter belongs to family 10. The *trpM* cDNA was sequenced to confirm the predicted introns, while a synthetic codon-optimized gene was used to create expression plasmid pFB06. *N*-terminally tagged hexahistidine TrpM fusion protein was produced in *E. coli* KRX and purified by immobilized metal chelate affinity chromatography (Figure S1).

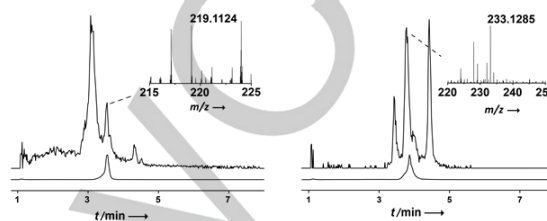


Figure 2. Mass spectrometric analysis of *P. serbica* mycelial extracts. Left panel: extracted ion chromatogram for *m/z* 219-220. At *t_R*=3.6 min, the mass of monomethylated **3**, e.g., L-abrine (**4**, calculated 219.1129 [*M*+H]⁺), found 219.1124) was detected. Right panel: extracted ion chromatogram for *m/z* 233-234. Only the signal at *t_R*=3.9 min (*m/z* 233.1285 [*M*+H]⁺) is consistent with the exact mass of dimethylated **3**, e.g., *N,N*- α -dimethyl-L-tryptophan (**5**, calculated *m/z* 233.1284 [*M*+H]⁺). Ion chromatograms of **4** and **5** standards are shown below the sample traces.

Gel permeation chromatography confirmed that TrpM is a monomer under native conditions (Figure S2), which is consistent with previous findings by Seebeck and colleagues on EgtD.^[6] Subsequently, TrpM was tested for activity *in vitro*. Hypothesizing that it catalyzes **3** methylation, we first used this substrate to test the activity of the recombinantly produced enzyme. Assays were run in TRIS-buffer (pH=8.0) for 15 min. For a time course of the reaction, samples were taken in 30 s intervals over 150 s, and subsequently analyzed by LC/MS (Figure 3, Figure S3). The analysis showed simultaneous formation of mono- and dimethylated **3** across this time course. One product was identical to an authentic standard of **4** regarding its retention time (*t_R*=16.6 min, Figure 3), UV/Vis spectrum, and molecular mass (*m/z* 219.1134 [*M*+H]⁺; calculated 219.1129 [*M*+H]⁺). The identity of the expected second product (**5**, *t_R*=15.6 min) was confirmed after purification by ¹H NMR spectroscopy (Figure S4). *K_m* values for **3** and **4** were 3.7 μ M and 1.0 μ M, respectively, as determined with a luminescence assay. The *k_{cat}* was $3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $2.9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Low *K_m* and *k_{cat}* values are well documented for other small molecule methyltransferases, e.g., for EgtD and EgtD_{E282A,M252V},^[6a-c] or the C-methyltransferase TyIC3 for L-mycarose biosynthesis.^[9] The *k_{cat}* values for the first and second TrpM-catalyzed methylation virtually do not diverge, which points to increased affinity of TrpM to the monomethylated intermediate, as indicated by the respective *K_m* values, which is also consistent with findings for EgtD.

Under standard conditions, **6** formation was not observed. In separate assays, *S*-adenosylhomocysteine (SAH) nucleosidase

For internal use, please do not delete. Submitted Manuscript

and adenine deaminase were added to irreversibly remove SAH from the reaction. After prolonged incubation for 4 h, **6** was detectable as minor product as well ($t_R=13.3$ min), besides **4** and **5** (Figure 3). 4-Hydroxy-L-tryptophan and D-tryptophan did not serve as substrate (Figure 3).

Psilocybe mushrooms control the PsiM-catalyzed methyl transfer steps during **1** biosynthesis by requiring substrates that have a 4-phosphoryloxy group. Consequently, tryptamine is not accepted. This important property minimizes, or prevents altogether, that the reactive and instable **2** is made. Otherwise, **2** could be formed from *N,N*-dimethyltryptamine which may undergo subsequent 4-hydroxylation by the rather unspecific monooxygenase PsiH. Here, we tested whether tryptamine was a substrate for TrpM. Under the applied conditions, turnover was not observed by chromatographic analysis, and not even traces of *N,N*-dimethyltryptamine or of its *N*-monomethyl precursor were detected by mass spectrometry (Figure 3, traces g and h). 4-Hydroxytryptamine was not turned over either. An important feature of **1** biosynthesis is that **2** formation is avoided. TrpM does not participate in **1** biosynthesis, but its substrate specificity prevents **2** formation as well, as the products of TrpM, **4**, **5**, and **6**, are not intermediates or shunt products of the **1** biosynthetic pathway. Both **1** and **5** biosynthesis originates from **3** (Scheme 1). However, cellular localization of the respective enzymes or mutually exclusive gene expression, e.g., dependent on the developmental stage, may prevent competition for **3** as principal building block.

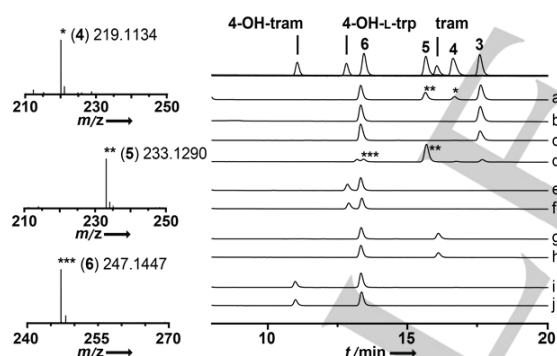


Figure 3. LC/MS analyses of TrpM *in vitro* activity tests. HR-ESIMS spectra were recorded in positive mode. Experimentally determined masses are indicated. Top trace: overlaid separate chromatograms of standard compounds. Trace a: TrpM reaction with **3**. Trace b: TrpM reaction with D-tryptophan. Trace c: control with heat-treated TrpM. Trace d: prolonged TrpM reaction with **3** in the presence of SAH nucleosidase and adenine deaminase. Traces e and f: TrpM reaction with 4-Hydroxy-L-tryptophan and negative control, respectively. Traces g and h: TrpM reaction with tryptamine and negative control. Traces i and j: TrpM reaction with 4-hydroxytryptamine and negative control. The signal at $t_R=12.9$ min corresponds to m/z 298.0974 $[M+H]^+$, which is compatible with the mass of 5-methylthioadenosine, a breakdown product of SAM. Tram: tryptamine, trp: tryptophan.

Given the activity of EgtD,^[6] we further tested if L-histidine was converted by TrpM *in vitro* as well. ESI-MS showed mono- and dimethylation whereas trimethylation was not found. L-tyrosine and L-phenylalanine were also mono- and dimethylated *in vitro*

(Figure S5). In mycelial extracts of *P. serbica*, mono- and dimethylated L-phenylalanine was identified by LC/MS (Figure S6) while not even traces of methyl derivatives of L-histidine and L-tyrosine were detected.

Seebeck et al. characterized the mycobacterial wild type EgtD (that is specific for L-histidine), the engineered variant EgtD_{E282A,M252V} (specific for **3**), and Ybs, an *Aspergillus* methyltransferase, specific for L-tyrosine.^[6] Our *in vitro* results indicate that TrpM is more flexible for acceptor substrates than the above methyltransferases. Yet, our data also support the notion that wild type EgtD is outstanding in that it efficiently trimethylates, while EgtD_{E282A,M252V} and TrpM virtually stop at the dimethyl stage. Of note, the residues of EgtD known to interact with the (methylated) α -amino group of L-histidine, Gly161 and Asn166, are conserved in TrpM (Gly192 and Asn197). Asn 166 in EgtD is essential to make *N,N*-dimethyl-L-histidine a 100-fold stronger ligand than L-histidine.^[6b] Crystallographic work would be warranted to elucidate the respective roles of active site residues for TrpM.

PsiM and TrpM share a functional relationship. Therefore, we hypothesized that the evolution of their respective pathways is correlated. To address this question, and to understand the evolutionary relationship between EgtD and **7** metabolism in fungi, we conducted a phylogenetic analysis of homologs of TrpM-coding genes in Agaricomycetes. A maximum likelihood tree places *trpM* in a clade with 12 orthologs from diverse agaricomycete species that is nested in a larger group of enzymes from a larger diversity of Agaricomycetes (Figure 4A, Figure S7). Homologs of *trpM* in this phylogeny are variable in structure; while all orthologs of *trpM* code for a single MT₃₃/EasF (EgtD) domain, the rest of the tree is composed mainly of EgtDB bifunctional proteins, with a C-terminally linked YfmG-superfamily sulfoxide synthase (EgtB) domain. Based on the topological congruence between the *trpM* clade and that of its mostly EgtDB sister clade (Figure 4A), which includes the *trpM* taxa, we infer that *trpM* originated by partial duplication of *egtDB* at an intermediate stage of agaricomycete diversification. The phylogeny also reveals at least ten recent (mostly species-specific) duplications that resulted in taxonomically diverse EgtD proteins. Since its origin by an ancient duplication, *trpM* has been periodically lost and is no longer present in most Agaricomycetes, and it is the only long-retained duplication in the phylogeny, suggesting EgtD-only paralogs have been instable during Agaricomycetes diversification. This instability is exemplified by the recent loss of EgtD in *P. cubensis* and pseudogenization in *P. cyanescens*, where it is truncated and contains an in-frame stop codon (Figure S8).

The functions of convergently evolved EgtD are only partly understood in fungi. The only other functionally characterized enzyme in the phylogeny (Figure 4A) is the *D. squaleus* EgtD previously predicted to produce **6**,^[6a] that is the product of a recent partial duplication of EgtD. *Pisolithus tinctorius* *egtD* genes, which may also be involved in the production of **6**, are distantly related homologs, analyzed separately (Figure S9A), while genes for EgtDB from *P. tinctorius* and other Boletales are present, along with four recent *egtD* paralogs from *Scleroderma citrina*. The gene for EasF is another distant *egtD* homolog in the

For internal use, please do not delete. Submitted Manuscript

Claviceps purpurea (ergot fungus, Ascomycota) ergotamine biosynthesis cluster, which is more similar to Ascomycota *egtDB* sequences than to *egtDB* sequences presented here (Figure S9B).

The phylogenetic distribution of gene families indicates ecological functions.^[10] EgtD is important for mycorrhizal formation aided by 6 in *P. tinctorius*,^[7a] which has four paralogs of a very distantly related *egtD*, all of which are co-orthologous with just one EgtD encoded in *Scleroderma citrinum* (Figure S9A). If the parallel recent expansion of *egtD* in *S. citrinum* (Figure 4A) represents convergent ectomycorrhiza-related metabolism, this is in contrast to the broader distribution of *egtD* homologs. The majority of Agaricomycetes with orthologs of *trpM* and/or recent *egtD* paralogs shown here are involved in lignocellulose decay, often of exposed substrates, which suggests their products are involved in competition with invertebrates or bacteria. It is also interesting to note that EgtD in the Saprolegniales (oomycetes) appears to have originated by partial horizontal transfer of an EgtDB from aquatic true fungi (Figure S9C).

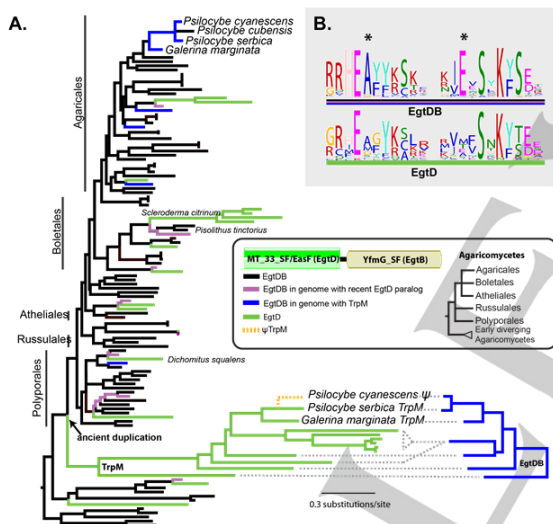


Figure 4. Evolutionary origin of TrpM and related enzymes. TrpM originated by partial duplication of a putative ergothioneine (7) bifunctional enzyme (EgtDB). A) Maximum Likelihood phylogeny of MT_33 Superfamily domains extracted from nearest PsiM homologs in Agaricomycetes (phylogeny with accession numbers in Figure S7A). EgtD enzymes (green branches) emerged once anciently (TrpM), and at least 10 times recently by partial duplication of bifunctional putative 7 synthesis enzyme EgtDB. There are few TrpM monofunctional proteins surviving since the ancient duplication in Agaricomycetes, and it has been lost in *P. cubensis* and pseudogenized in *P. cyanescens*. The *P. cyanescens* pseudogene (ψ) is shown for illustration, but was not included in phylogenetic analysis. A reversed phylogeny of EgtDB enzymes from genomes containing TrpM (see also Figure S7B) demonstrates topological congruence between the alternate paralogs. Species phylogeny in the key follows Hibbett et al.^[11] B) Motifs associated with specificity-determining residues (*) 252 (left) and 282 (right) of Agaricomycetes EgtD domains/proteins. Position number is relative to *M. smegmatis* EgtD (A0R5M8.1).

The evolutionary instability of EgtD is consistent with a transition from a broadly selected function in 7 biosynthesis^[12] to one in secondary metabolism, which tends to be conditionally retained through diversifying ecological selection. In keeping with functional diversification of EgtD in Agaricomycetes, the substrate specificity-determining amino acid position 282 (relative to *Mycobacterium smegmatis*) is highly conserved as glutamic acid for histidine binding in 97 EgtDB sequences, but is variable as mainly Met, Thr, Glu, Ala, and Ser in 25 EgtD sequences (Figure 4B). Similarly, position 252 is highly conserved as alanine in EgtDB, but is variable as mainly Ala, Met, Gly, and Ser in EgtD.

It is also plausible that fitness costs to the organism account in part for the instability of recently evolved EgtD, by detrimentally interfering with 7 synthesis due to the irreversibility of histidine *N*-methylation; this hypothesis should ultimately be tested in a genetically tractable model fungus. Gene duplication has long been identified as a source of genetic novelty,^[13] and has strongly influenced the metabolic diversity of fungi through the sub- and neofunctionalization of paralogs.^[14] Further, gene fissions are important sources of novel functions in fungi and oomycetes.^[15] We have characterized the function of TrpM, a methyltransferase generated by duplication of the first domain of a presumed 7 synthesis bifunctional enzyme, EgtDB. We further demonstrated several convergent origins of EgtD in Agaricomycetes by the same mechanism. Filamentous Ascomycota maintain their EgtD enzymes encoded in diverse secondary metabolism gene clusters, which can be specialized and retained in large pan-genomes, and acquired by horizontal gene transfer (HGT).^[16] However, our data indicate that Basidiomycota benefit more from *de novo* neo-functionalization of vertically-inherited enzymes because of lower rates of clustering and HGT.

Our results highlight a secondary metabolism evolvability mechanism, in which weakly or sporadically selected functions remain accessible through their preservation in a widely distributed, structurally conserved bifunctional protein. Selection on within-protein interactions and broadly conserved functions possibly maintain these domains as a source of secondary metabolic diversity, where they otherwise are lost in transiently adaptive roles. In short, genes for these highly conserved bifunctional proteins may function as genetic templates from which less conserved functions can repeatedly evolve. Traditionally, the fungal genus *Psilocybe* impacted natural product chemistry due to its capacity to biosynthesize 1. Our results demonstrate that the relevance of this genus reaches further and help address more fundamental aspects of the evolution of fungal small molecule-processing enzymes.

Experimental Section

General and microbiological procedures: *P. serbica* FSU12416 was grown at 25°C in the dark on malt extract peptone (MEP) agar plates or in MEP liquid medium shaken at 140 rpm for 20 d at room temperature. Plasmid isolation, DNA restriction and ligation followed the instructions of the manufacturers of kits and enzymes (NEB, Promega, Thermo, Zymo).

For internal use, please do not delete. Submitted Manuscript

Chemicals, media ingredients and solvents were purchased from Roth, Sigma-Aldrich, VWR, and Deutero.

Cloning of *trpM* cDNA and construction of expression plasmid: mRNA was isolated from *P. serbica* mycelium using Promega's SV Total RNA isolation kit. First strand cDNA synthesis was primed with oligo-d(T)-primers and RevertAid reverse transcriptase. The first strand reaction served as template in a subsequent PCR with primers (0.2 μ M each) oFB51 (5'-ATGCCGCGAATCCAGGTT-3') and oFB52 (5'-TTAGCTTCGTCGGTTACTTCG-3'). The reaction contained 0.2 mM (each) deoxynucleoside triphosphate, 2 mM MgSO₄, in HF buffer that was supplied with the enzyme (Phusion DNA polymerase, 1 U). Amplified DNA was purified by agarose gel electrophoresis and subsequent extraction from the gel. The PCR amplicon was ligated to pJET1.2 and several clones were sequenced to confirm predicted exon/intron junctions. For heterologous production of TrpM, *E. coli* KRX (Promega) and a codon-optimized gene (Invitrogen) were used that was inserted between the BamHI and XhoI sites of pET28a, to create expression plasmid pFB06. The codon-optimized sequence is provided in Figure S10, the genomic DNA sequence of *trpM* is deposited at GenBank under accession number MH423322.

Protein purification: Cultivation of *E. coli* and gene expression were performed as described.^[17] TrpM was purified by metal chelate affinity chromatography on Protino Ni²⁺-NTA agarose (Macherey-Nagel). Purification was verified by polyacrylamide gels (12% Laemmli gel), and protein concentrations were determined by Bradford's method.^[18] TrpM was desalted on a PD-10 column (GE Healthcare), equilibrated with buffer (50 mM TRIS-HCl, pH 8.0) for enzyme assays. Production of *E. coli* S-adenosylhomocysteine nucleosidase and adenine deaminase^[6] using pET28-based expression plasmids followed the same protocol, except that the *E. coli* culture to express the adenine deaminase gene was supplemented with 50 μ M 2,2'-bipyridyl and 1 mM MnCl₂. For size-exclusion chromatography, TrpM was eluted in phosphate buffer (10 mM sodium dihydrogen phosphate, 140 mM NaCl, pH 7.4). Size-exclusion chromatography was performed by FPLC (Äkta Pure 25, GE Healthcare) and a Superdex 200 increase 10/300 GL column with 24 mL bed volume. Signals were referenced to the GE Healthcare high molecular weight standard.

Product formation by TrpM: *In vitro* TrpM assays were carried out in triplicates in a volume of 200 μ L, buffered in 50 mM TRIS-HCl, pH=8.0, the enzyme concentration was 200 nM. The methyl acceptor (3 or others) was added at 500 μ M final concentration, SAM at 1.5 mM. The reactions were incubated at 25°C for 15 min. The time course with 3 as acceptor substrate included additional sampling in 30 s intervals from 0-150 s. The reaction with SAH-nucleosidase and adenine deaminase was incubated for 4 h. Reactions were stopped in liquid nitrogen and then lyophilized, dissolved in MeOH and centrifuged. The supernatant was collected for chemical analysis. TrpM kinetics were recorded using the MTase-Glo luminescence assay (Promega).

Chemical analysis of TrpM assays: LC/ESI-MS analyses of TrpM *in vitro* assays were carried out on an Agilent Infinity 1260 instrument with a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (150 \times 4.6 mm, 5 μ m particle size, flow: 1 mL min⁻¹), coupled to an Agilent 6130 Single Quadrupole mass detector. Diode array detection was between λ =200–400 nm. Chromatograms were extracted at λ =280 nm. To analyze indolic compounds, the following linear gradient was applied with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in H₂O (solvent A) and methanol (MeOH, solvent B): initially 5% B, increased to 15% within 5 min, to 37% B within further 13 min, and to 100% B within 1 min. LC/HRESIMS was performed on a Thermo Accela liquid chromatograph coupled to an Exactive Orbitrap spectrometer operated in positive and negative mode and equipped with a C18 column. Solvent A was 0.1% (v/v) formic acid in H₂O, solvent B was acetonitrile (ACN). To analyze mycelial extracts for methylated L-phenylalanine, a Grom-Sil 100 ODS-0 AB, 250 \times 4.6 mm, 3

μ m particle size and the following conditions were used: initial hold at 5% B for 1 min, linear gradient to 100% B within 15 min at a flow rate of 1 mL min⁻¹. For other analyses, a Betasil C18 column (150 \times 2.1 mm, 3 μ m particle size) and these conditions were used: initial hold at 5% B for 1 min, a linear gradient of 5-98% B within 15 min at a flow of 0.2 mL min⁻¹.

Chemical analysis of *P. serbica* extracts: To prepare mycelium for LC/HRESIMS-analyses, it was collected from liquid cultures by filtration, washed with distilled water, blotted dry, snap-frozen in liquid nitrogen, homogenized with mortar and pestle, and shaken in 200 mL MeOH for 18 h at 240 rpm, before the biomass was removed by filtration and dried over sodium sulfate. Residual solvent was evaporated under reduced pressure. The dry residue was dissolved in MeOH, filtered, and subjected to LC/HRESIMS measurements (above).

Purification and NMR spectroscopy: From *in vitro* assays, 5 was purified in two steps on the above instrument. The first step was accomplished with an Eclipse XDB-C18 column (250 \times 9.4 mm, 5 μ m particle size). H₂O + 0.1% TFA was solvent A and MeOH solvent B. A linear gradient (2 mL min⁻¹) was applied, beginning with 5% B, increased to 15% in 5 min, to 37% B within 18 min, and to 100% B within 1 min. The second purification step included a Hypercarb column (150 \times 4.6 mm, 5 μ m), 0.1% TFA in H₂O as solvent A and ACN as solvent B. A linear gradient (1 mL min⁻¹) was applied, beginning with 21% B and increased to 100% B in 9 min. The ¹H NMR spectrum of 5 was recorded at 300 K on a Bruker Avance III spectrometer at 500 MHz in D₂O. Chemical shifts were referenced to residual non-deuterated solvent (δ =4.79 ppm).

Bioinformatic analysis: Initially, Blast^[19] and Augustus (v.3.3.1)^[20] software was used to browse the *P. serbica* genome.^[6a] Homologs of *trpM* were obtained from a local database of 540 fungal and oomycete proteomes using usearch (v. 8.0.1517)^[21] with TrpM (KDR66884.1) and EgtDB (KDR82860.1) from *G. marginata* as queries, an e-value of 1e⁻³, and protein identity of 30%. Domain structure of proteins was determined using rpsblast (NCBI BLAST v. 2.6.0+)^[19] to search the NCBI Conserved Domain Database (v. 3.16)^[22] with an e-value of 0.001. Absence of YfmG superfamily domains in proteins was confirmed by tblastn against the respective genome assemblies using the nearest EgtDB sequence from phylogenies (see below) as a query. MT_33 superfamily domains were extracted from protein sequences using hmmer (v. 3.1b2).^[23] MT_33 phylogenies were constructed by first aligning with mafft (v. 7.221),^[24] removing ambiguously aligned characters with Trimal (v. 1.4)^[25] using the -automated1 method. Exploratory phylogenetic analyses were performed using fasttree (v. 2.1.7).^[26] A well-supported clade consisting exclusively of Agaricomycetes was selected for subsequent analyses. For analyses of distant relatives of TrpM, hmmer was used to search for MT_33 domains (952 total) across the proteome database. Figure S9A (*P. tinctorius* EgtD) combined the same four additional Agaricomycetes rooting sequences along with near and distant clades of Boletales EgtDB/EgtD. Figure S9B (EasF) combined two clades of Pezizomycotina MT_33 homologs with two orthologs each encoding Agaricomycetes TrpM and EgtDB for rooting. Figure S9C (oomycetes EgtD) combines a clade of early diverging fungi that includes oomycete EgtD sequences and the Agaricomycetes root. Datasets were re-aligned and curated as above, followed by maximum likelihood analysis using RAxML (v. 8.2.9)^[27] with the model (LG) selected automatically according to Bayesian information criterion. Protein domains identified by rpsblast were mapped to the Agaricomycetes PsiM2/EgtDB phylogeny using the ETE Toolkit (v. 3.1.1).^[28]

Acknowledgments

We thank A. Perner H. Heinecke, F. Baldeweg, and H. Schoeler (Hans Knöll Institute Jena) for recording high-resolution mass

For internal use, please do not delete. Submitted Manuscript

spectra, for recording and interpreting NMR spectra, and for luminescence measurements, respectively. M. Gressler (Friedrich Schiller University Jena) is acknowledged for helpful comments on the manuscript. We also thank F.J. Ruiz-Dueñas, Ph.D. (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain), J.M. Barrasa, Ph.D. (Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Spain), D.S. Hibbett, Ph.D. (Clark University, Worcester, MA, USA), D. Lindner, Ph.D. (US Dept. of Agriculture, Forest Service, Madison, WI, USA), and L. Nagy, Ph.D. (Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary), for access to unpublished genome sequences. These data were produced by the US Department of Energy Joint Genome Institute in collaboration with the user community. Evolutionary analyses were performed using the resources of the Ohio Supercomputer Center. This work was supported by the National Science Foundation grant (grant DEB-1638999 to JCS) and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, grant HO2515/7-1 to DH). Work in DH's laboratory is also funded by the Collaborative Research Center ChemBioSys (SFB1127).

Keywords: biosynthesis • enzymes • methyltransferase • psilocybin • tryptophan

- [1] a) A. Hofmann, R. Heim, A. Brack, H. Kobel, A. Frey, H. Ott, T. Petrzilka, F. Troxler, *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 1557-1572; b) A.Y. Leung, A.H. Smith, A.G. Paul, *J. Pharm. Sci.* **1965**, *54*, 1576-1579.
- [2] a) D.E. Nichols, *Pharmacol. Ther.* **2004**, *101*, 131-181; b) F. Hasler, U. Grimberg, M.A. Benz, T. Huber, F.X. Vollenweider, *Psychopharmacol.* **2004**, *172*, 145-156.
- [3] a) C.S. Grob, A.L. Danforth, G.S. Chopra, M. Hagerty, C.R. McKay, A.L. Halberstadt, G.R. Greer, *Arch. Gen. Psychiat.* **2011**, *68*, 71-78; b) M.W. Johnson, A. Garcia-Romeu, M.P. Cosimano, R.R. Griffiths, *J. Psychopharmacol.* **2014**, *28*, 983-992; c) A.M. Sherwood, T.E. Prisinzano, *Exp. Rev. Clin. Pharmacol.* **2018**, *11*, 1-3.
- [4] a) J. Fricke, F. Blei, D. Hoffmeister, *Angew. Chem. Intl. Ed.* **2017**, *56*, 12352-12355; b) H.T. Reynolds, V. Vijayakumar, E. Gluck-Thaler, H.B. Korotkin, P.B. Matheny, J.C. Slot, *Evol. Lett.* (doi: 10.1002/evl3.42); c) F. Blei, F. Baldeweg, J. Fricke, D. Hoffmeister, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 10028-10031; d) J. Fricke, F. Blei, D. Hoffmeister, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 12524-12527.
- [5] S. Ghosal, S.K. Dutta, *Phytochemistry* **1971**, *10*, 195-198.
- [6] a) A. Vit, L. Misson, W. Blankenfeldt, F. P. Seebeck, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 119-125; b) L. Misson, R. Bum, A. Vit, J. Hildesheim, M.A. Beliaeva, W. Blankenfeldt, F.P. Seebeck, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 1333-1342; c) F.P. Seebeck, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6632-6633.
- [7] a) T. Kawano, *Plant Cell Rep.* **2003**, *21*, 829-837; b) A. Jambois, A. Dauphin, T. Kawano, F.A. Dilegou, F. Bouteau, V. Legue, F. Lapeyrie, *Physiol. Plantarum* **2005**, *123*, 120-129.
- [8] A. Vit, L. Misson, W. Blankenfeldt, F.P. Seebeck, *Acta Crystallogr. F* **2014**, *70*, 676-680.
- [9] H. Chen, Z. Zhao, T.M. Hallis, Z. Guo, H.-w. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *40*, 607-610.
- [10] D. Floudas, M. Binder, R. Riley, K. Barry, R.A. Blanchette, B. Henrissat, et al. *Science*, **2012**, *336*, 1715-1719.
- [11] D.S. Hibbett, M. Binder, J.F. Bischoff, M. Blackwell, P.F. Cannon, O.E. Eriksson, et al., *Mycol. Res.* **2007**, *111*, 509-547.
- [12] G.W. Jones, S. Doyle, D.A. Fitzpatrick, *Gene*, **2014**, *549*, 161-170.
- [13] S. Ohno, *Evolution by gene duplication*, 1st ed., Springer-Verlag, Heidelberg, **1970**.
- [14] a) I. Wapinski, A. Pfeffer, N. Friedman, A. Regev, *Nature*, **2007**, *449*, 54-61; b) J.H. Wisecaver, J.C. Slot, A. Rokas, *PLoS Genetics*, **2014**, *10*, e1004816.
- [15] G. Leonard, T.A. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2012**, *109*, 21402-21407.
- [16] M. Marcel-Houben, T. Gabaldón, *Fungal Genet. Biol.*, **2016**, *86*, 71-80.
- [17] D. Kalb, T. Heinekamp, S. Schieferdecker, M. Nett, A. A. Brakhage, D. Hoffmeister, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 1813-1817.
- [18] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- [19] S. F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389-3402.
- [20] M. Stanke, R. Steinkamp, S. Waack, B. Morgenstern, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W309-312.
- [21] R.C. Edgar, *Bioinformatics*, **2010**, *26*, 2460-2461.
- [22] A. Marchler-Bauer, M.K. Derbyshire, M.R. Gonzales, S. Lu, F. Chitsaz, L.Y. Geer, et al., *Nucleic Acids Res.*, **2015**, *43*, D222-226.
- [23] S.R. Eddy, *Bioinformatics*, **1998**, *14*, 755-763.
- [24] K. Katoh, D.M. Standley, *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772-780.
- [25] S. Capella-Gutierrez, J.M. Silla-Martinez, T. Gabaldón, *Bioinformatics*, **25**, **2009**, 1972-1973.
- [26] M.N. Price, P.S. Dehal, A.P. Arkin, *PLoS One*, **2010**, *5*, e9490.
- [27] A. Stamatakis, *Bioinformatics*, **2014**, *30*, 1312-1313.
- [28] J.F. Huerta-Cepas, S. Serra, P. Bork, *Mol. Biol. Evol.*, **2016**, *33*, 1635-1638.

Table of Contents

Figure S1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of TrpM	2
Figure S2. Size exclusion chromatography with TrpM.....	3
Figure S3. Time course of TrpM-catalyzed product formation.....	4
Figure S4. ¹ H NMR spectrum of <i>N,N</i> -dimethyl-L-tryptophan.....	5
Figure S5. Mass spectrometric analysis of <i>in vitro</i> TrpM substrate specificity tests	6
Figure S6. Mass spectrometric analysis of <i>P. serbica</i> extracts.....	7
Figure S7. Phylogeny and structure of MT_33 domain-containing proteins	8
Figure S8. Alignment of <i>Psilocybe serbica</i> TrpM with <i>P. cyanescens</i> ψ TrpM	11
Figure S9. Phylogenies of distant paralogs of TrpM	12
Figure S10. Codon-optimized sequence of <i>trpM</i>	15

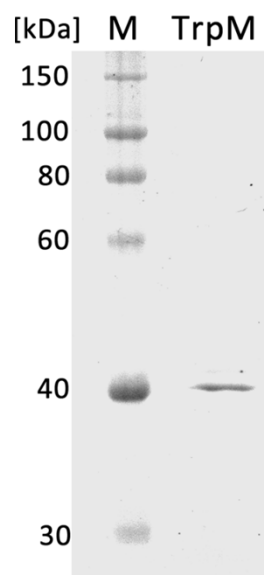


Figure S1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis with recombinantly produced hexahistidine-tagged *Psilocybe serbica* tryptophan methyltransferase TrpM. M: Molecular weight marker, sizes are indicated. The expected mass of *N*-terminally His-tagged TrpM is 43.2 kDa.

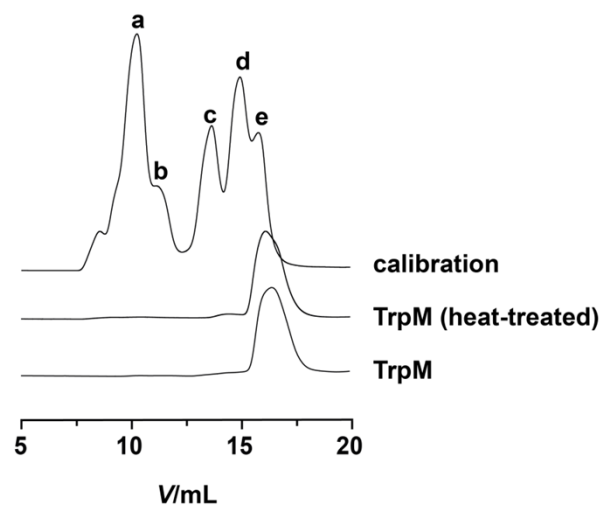


Figure S2. Size exclusion chromatography with intact and heat-treated *Psilocybe serbica* methyltransferase TrpM. Proteins were loaded onto a Superdex 200 column and eluted using 10 mM phosphate buffer with 140 mM NaCl. Heat-treated TrpM enzyme eluted at 16.2 mL (corresponding to ca. 42 kDa), the untreated active enzyme appeared at the same volume, *i.e.*, the approximate mass of monomeric TrpM. The calculated mass of monomeric *N*-terminally His-tagged TrpM is 43.2 kDa. The calibration track includes thyroglobulin (a, 669 kDa), ferritin (b, 440 kDa), aldolase (c, 158 kDa), conalbumin (d, 75 kDa), and ovalbumin (e, 43 kDa).

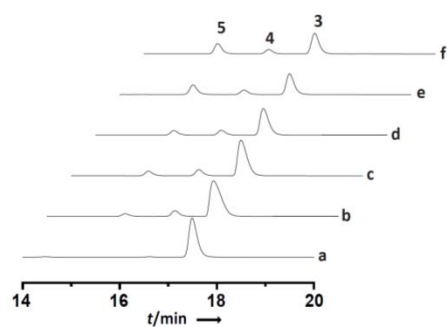


Figure S3. Time course of the TrpM reaction over 150 s. The chromatographic analysis shows simultaneous L-tryptophan (**3**) mono- and dimethylation (**4**: L-abrine, **5**: *N,N*- α -dimethyl-L-tryptophan). Trace a: negative control (heat-inactivated enzyme); traces b-f: reactions stopped after 30, 60, 90, 120, and 150 s, respectively.

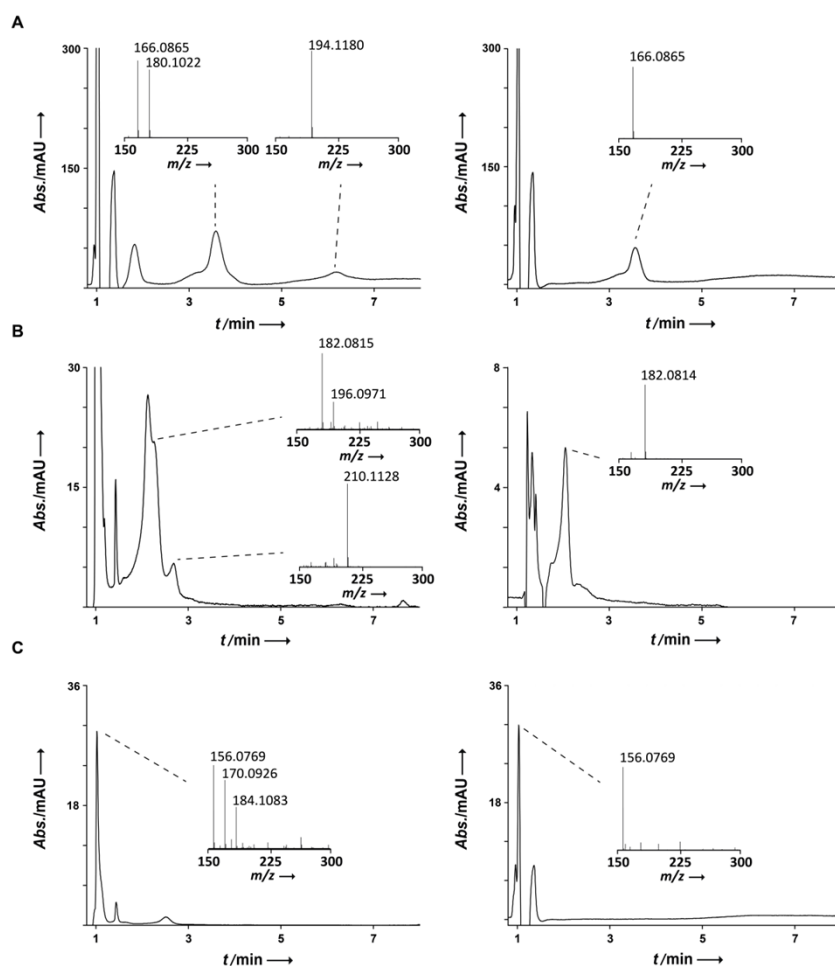


Figure S5. LC/MS analyses of *in vitro* substrate specificity tests with TrpM. The analyses were run in positive mode.

A) Left panel: detection of L-phenylalanine, m/z 166.0865 $[M+H]^+$ (calculated: 166.0868) and its monomethylated congener (m/z 180.1022 $[M+H]^+$, calculated: 180.1025) at $t_R=3.7$ -3.8 min, and detection of dimethylated L-phenylalanine with m/z 194.1180 $[M+H]^+$ (calculated: 194.1181) at $t_R=6.2$ min. Right panel: negative control with heat-treated TrpM ($t_R=3.7$ min).

B) Left panel: detection of L-tyrosine, m/z 182.0815 $[M+H]^+$ (calculated: 182.0817), monomethylated L-tyrosine (m/z 196.0971 $[M+H]^+$, calculated: 196.0973) at $t_R=2.1$ -2.2 min, and detection of dimethylated L-tyrosine with m/z 210.1128 $[M+H]^+$ (calculated: 210.1130) at $t_R=2.7$ min. Right panel: negative control ($t_R=2.1$ min).

C) Left panel: detection of L-histidine, m/z 156.0769 $[M+H]^+$ (calculated: 156.0773), monomethylated L-histidine (m/z 170.0926 $[M+H]^+$, calculated: 170.0929), and dimethylated L-histidine (m/z 184.1083 $[M+H]^+$, calculated: 184.1086) ($t_R=1.0$ min). Right panel: negative control ($t_R=1.0$ min).

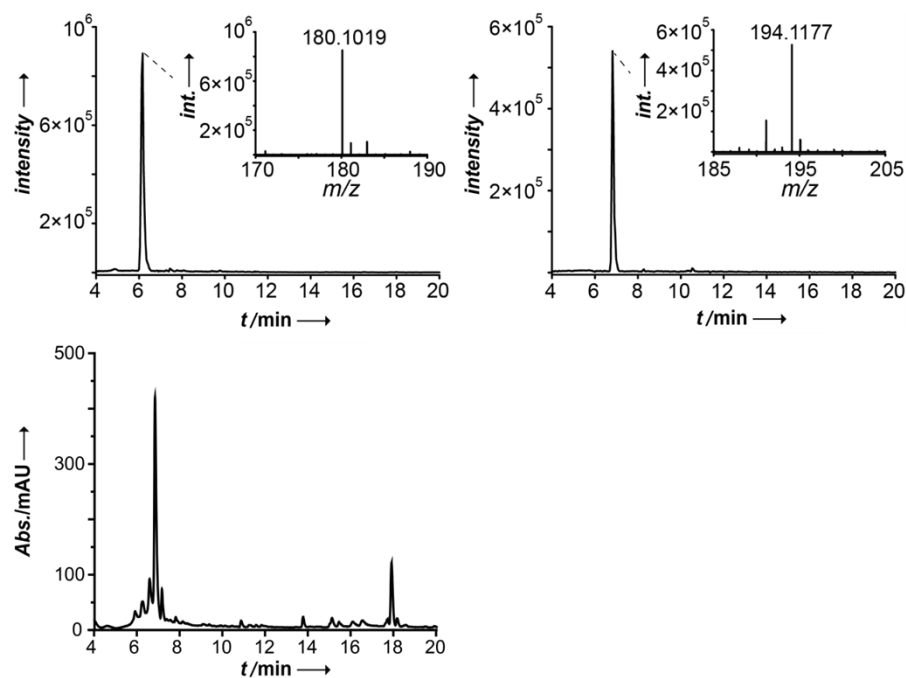
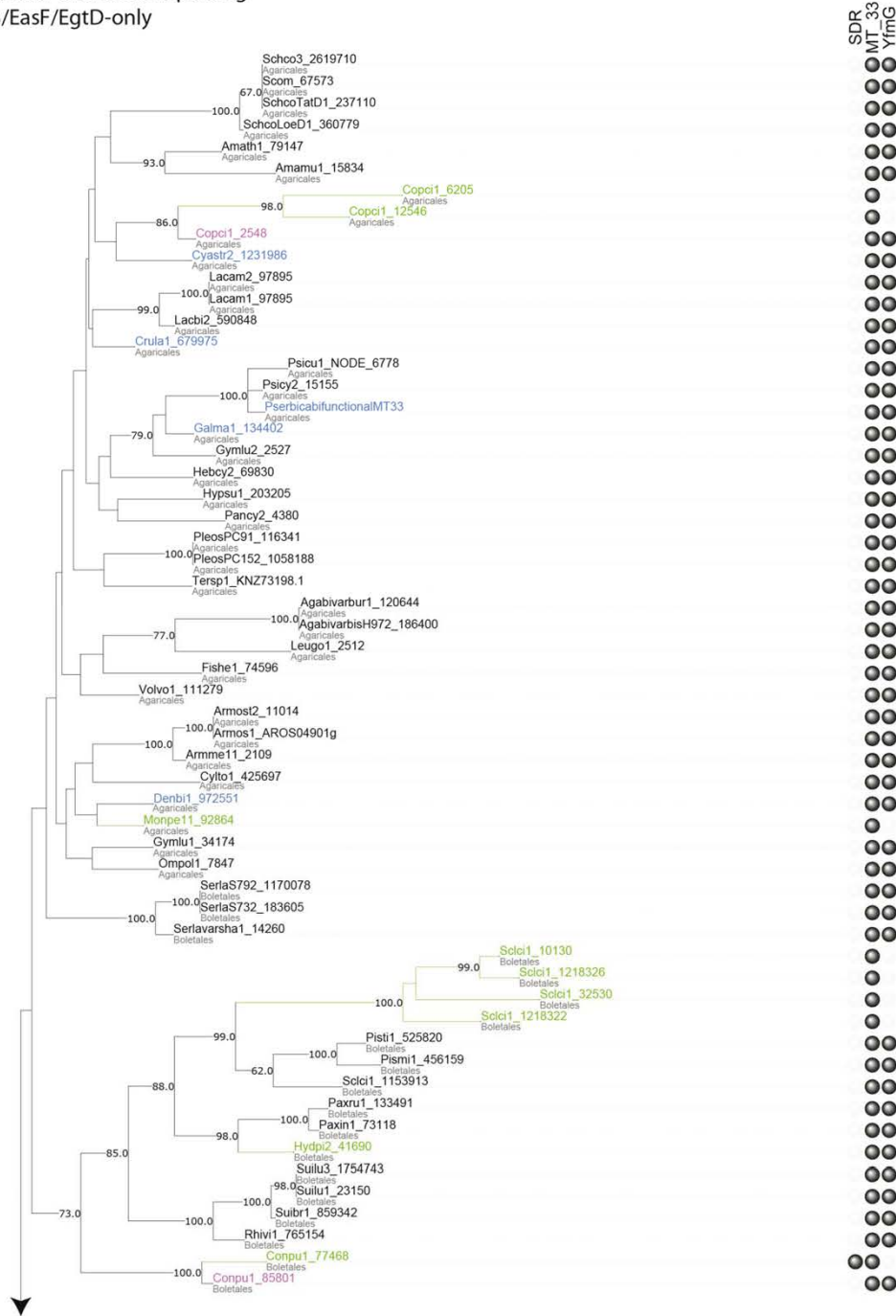


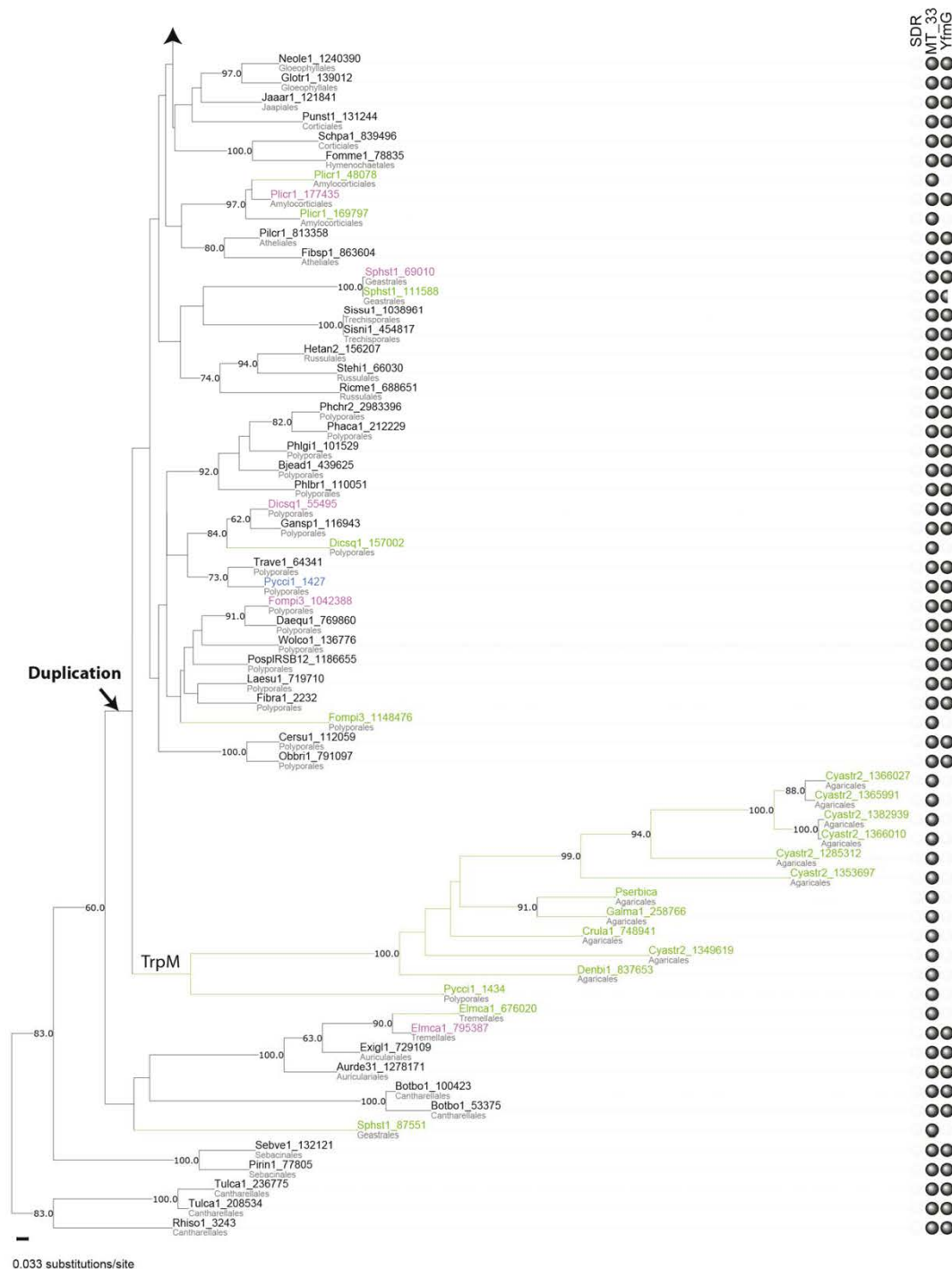
Figure S6. LC/MS analyses of *P. serbica* extracts to detect methylated L-phenylalanine. Upper left panel: extracted ion chromatogram for m/z 180-181. At $t_R=6.2$ min, the mass of monomethylated L-phenylalanine, (m/z 180.1019 $[M+H]^+$, calculated: 180.1025) was detected. Upper right panel: extracted ion chromatogram for m/z 194-195. The detected mass at $t_R=6.8$ min (m/z 194.1177 $[M+H]^+$, calculated: 194.1181) is consistent with dimethylated L-phenylalanine. Lower panel: corresponding HPLC trace.

A)

MT_33 Phylogeny

- bifunctional
- bifunctional with recent paralog
- bifunctional with ancient paralog
- MT_33/EasF/EgtD-only





B)

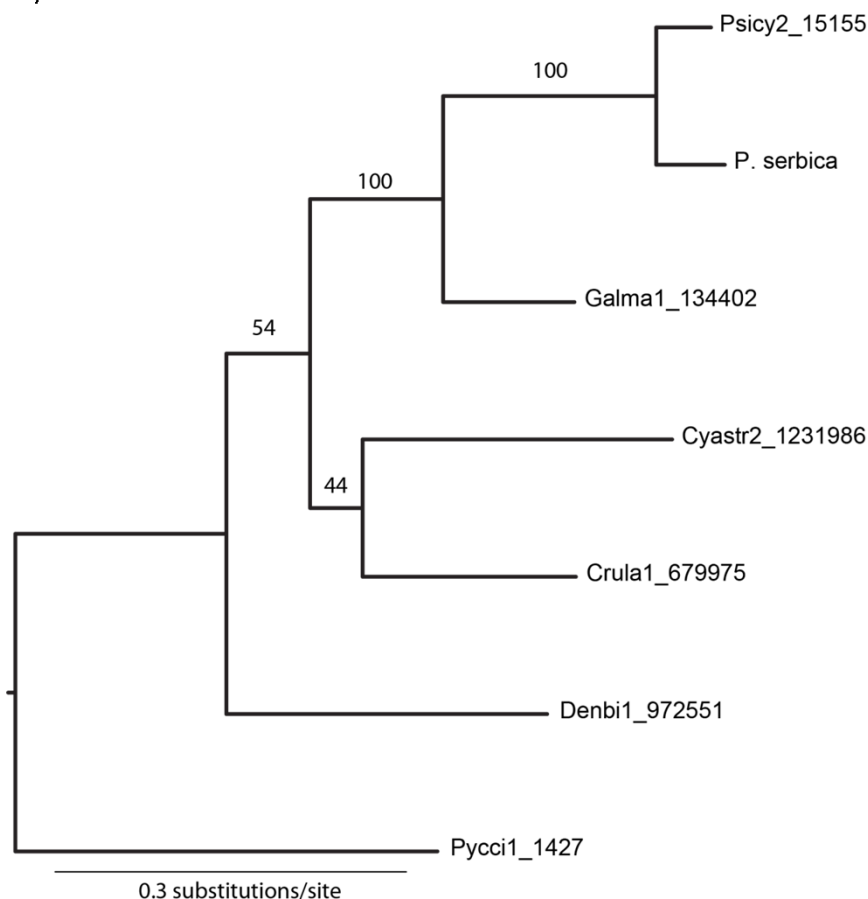
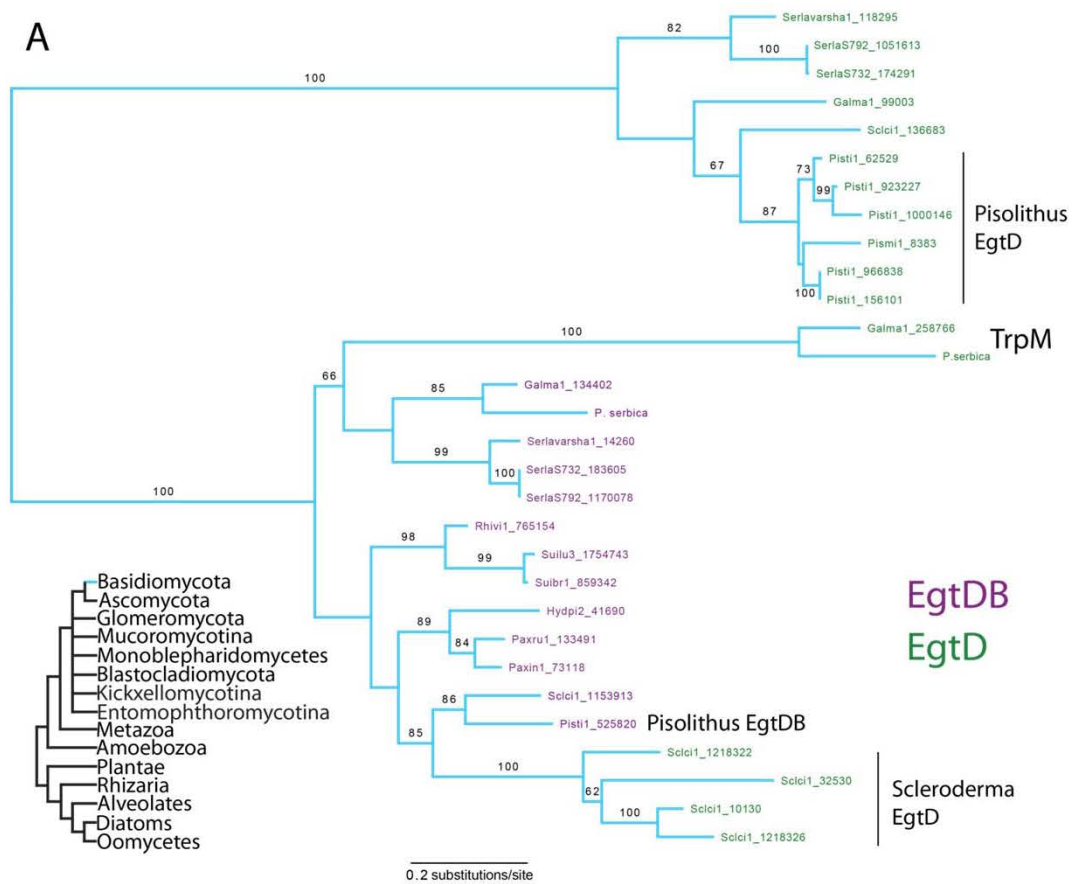


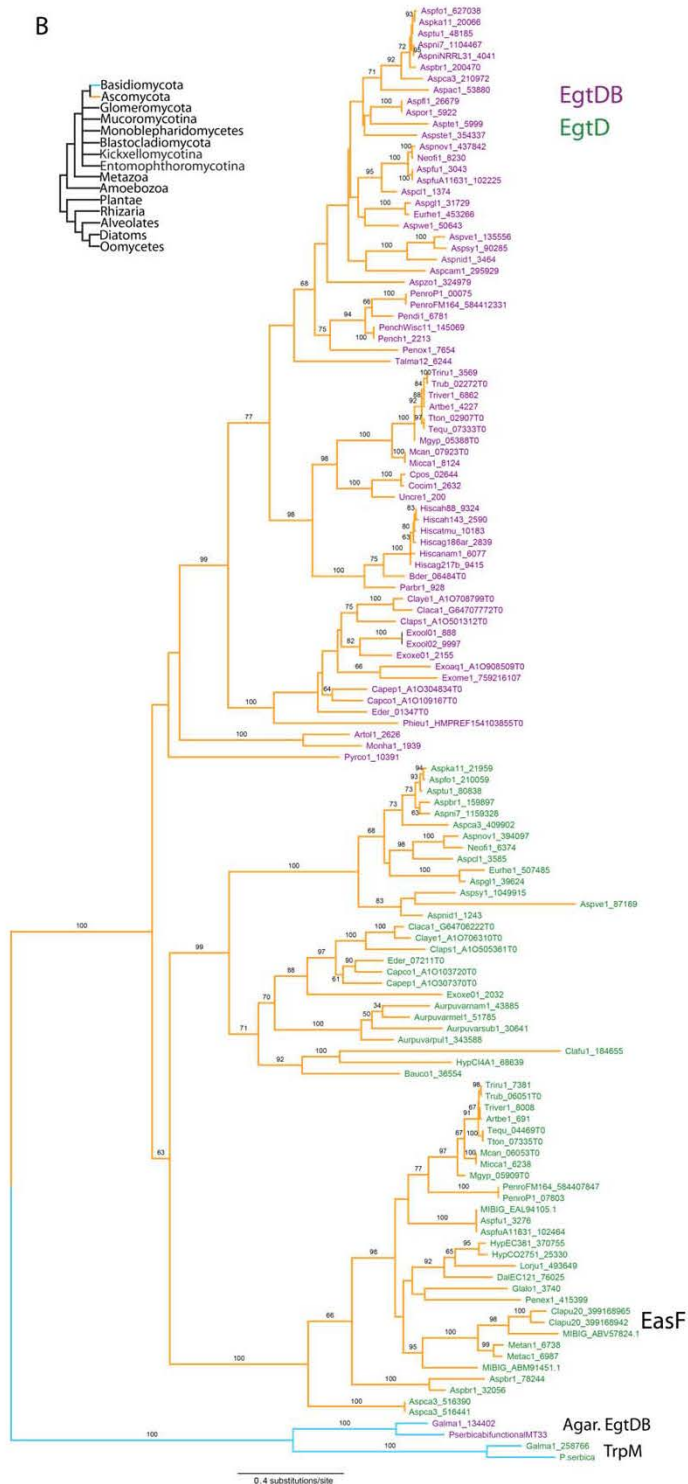
Figure S7. Phylogeny and structure of MT_33 domain containing proteins in Agaricomycetes.

A) Maximum likelihood phylogeny (left) indicates protein model accessions (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi>), and fungal order. Node support is out of 100 maximum likelihood bootstrap replicates (see Methods). (Putative) monofunctional methyltransferase terminals are in green, while bifunctional are in black (no paralog in this phylogeny), violet (has recent monofunctional paralog), or blue (has ancient monofunctional paralog, i.e. TrpM). Domain presence is indicated to the right (SDR = Short-chain dehydrogenases/reductases, MT_33 = Histidine-specific methyltransferase, SAM-dependent [EgtD], and YfmG = Formylglycine-generating enzyme, required for sulfatase activity, contains SUMF1/FGE domain [EgtB]). B) Maximum likelihood phylogeny of EgtDB from genomes with TrpM.

<i>P. serbica</i>	MPRIQVLDIRGSKESVGSTPHLRRAAILEGLLKPPGSRTLPSETLYDEVGLKM
<i>P. cyanescens</i>	MLLIQVLDIRSKDSLGSIPHLQTAILEGLLKPPGNRTLPSETLYDEVGLKM
consensus	M.hIQVLDIRtSK-SlGShPHLpsAILEGLLKPPGsRTLPSETLYDEVGLKM
<i>P. serbica</i>	YNDGMKAWAEWYYPVEAERQILERYGRDIAKLFTTSAGKAVLIELGAGSLD
<i>P. cyanescens</i>	YNGRMKAWAEWYYPVKAERQILELYGSEITKLFNTSANGNTVLIELSAGSLD
consensus	YNstMKAWAEWYYPVcAERQILEhYGp-IsKLFsTSApGpsVLIELuAGSLD
<i>P. serbica</i>	KTSQVLLSAAEITRTTGPMNNIAYYALDLERGELEERTIGRLQEVIQDIAGK
<i>P. cyanescens</i>	KTLQILLSAADQIS--GVAGTIKYYALDLERSELEHTIGRLQDIIGD* IAGK
consensus	KT.QlLLSAA-.h..oGshssItYYALDLERuELE+TIGRLQ-lIGD.IAGK
<i>P. serbica</i>	ISTAGMWGTYDDGIRVIEKNELELEPDIPVHILFLGGTIGNFSKQDGDVAFI
<i>P. cyanescens</i>	IDTVGLWGTYNDGIRIIKKNELGLEPNTPIHILFLGGTIGNFSKQDDDVAFI
consensus	IsTsGhWGTySdGIRlIcKNELtLEPshPlHILFLGGTIGNFSKQDsDVAFL
<i>P. serbica</i>	KSLPLDCHKRGDTLLVGMMDRHKSAADAIERSYGFAAAKDWIMNGLKVSGRVLTG
<i>P. cyanescens</i>	KSLPLDSRRGDTLLIRMDRIKPADIIERAYGFAAAEKWIIRKLPVSGRYHWK
consensus	KSLPLDp+RGDTLLltMDRhKsADhIERuYGFAAAccWThptL.VSGRhhht
<i>P. serbica</i>	DEGLFEIGNWERYAKYNEELGRYEAGYKSQKEHALKISEGVDITFLKDEVVL
<i>P. cyanescens</i>	LQQAR*-----
consensus	.pthh.
<i>P. serbica</i>	VMFSNKYTDAMDSVVDSAGLVKNGSWMDEKAQYCLLSLRANNGPV*
<i>P. cyanescens</i>	-----
consensus	

Figure S8. Alignment of *Psilocybe serbica* TrpM with the *P. cyanescens* pseudogene (ψ TrpM). *P. serbica* TrpM was confirmed by cDNA sequence, and *P. cyanescens* ψ TrpM is the best conceptual translation of the corresponding genomic region. Inferred stop codons (asterisks) are highlighted red. In the consensus, lower-case letters indicate o = alcohol, l = aliphatic, c = charged, h = hydrophobic, - = negative, p = polar, + = positive, s = small, u = tiny, and t = turnlike amino acid residues.





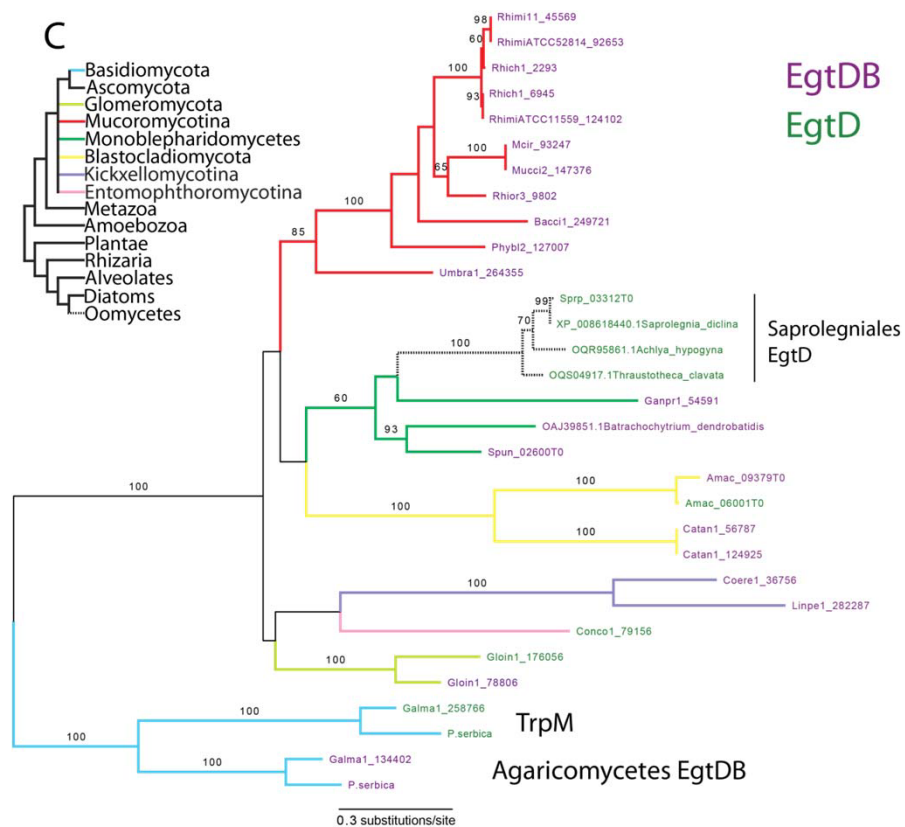


Figure S9. Phylogenies of distant paralogs of TrpM. Maximum likelihood phylogenies indicate protein model accessions (<https://genome.igi.doe.gov/programs/fungi>, NCBI) for A) distant EgtD paralogs in Boletales, or B) distantly related EgtD paralogs in Ascomycota, including EasF, or C) in Saprolegniales. EgtD proteins are in green, and paralogous EgtDB proteins are in violet. Node support is out of 100 maximum likelihood bootstrap replicates (see Methods). Inset phylogeny is based on Hibbett et al.^[1] and Burki et al. (2012).^[2]

[1] D.S. Hibbett, M. Binder, J.F. Bischoff, M. Blackwell, P.F. Cannon, O.E. Eriksson, et al., *Mycol. Res.* **2007**, *111*, 509-547.

[2] F. Burki, N. Okamoto, J.F. Pombert, P.J. Keeling, *Proc Royal Society of London B: Biological Sciences*, **2012**, rspb20112301.

ATGCCTCGTATTCAGGTTCTGGATATTCGTGGTAGCAAAGAAAGCGTTGGTAGCACACCGCATCTGCGT
 GCAGCAATTCTGGAAGGTCTGCTGAAACCGCCTGGTAGCCGTACCCTGCCGAGCGAAACCCCTGTATGAT
 GAAGTTGGTCTGAAAATGTATAACGACGGTATGAAAGCATGGGCAGAATGGTATTATCCGGTTGAAGCA
 GAACGTCAGATTCTGGAACGTTATGGTCGTGATATTGCCAACTGTTTACCACCAGTGCAAAAGGTAAAG
 CCGTTCTGATTGAACTGGGTGCAGGTAGCCTGGATAAAACCAGCCAGGTTCTGCTGAGCGCAGCCGAA
 ATTACCCGTACCACCGGTCCGATGAATAACATTGCATATTATGCACTGGATCTGGAACGCGGAGAACTG
 GAACGTACCATTGGTCGTCTGCAAGAAGTTATTGGCGATCAGATTGCAGGTAAAATTAGCACCCGAGGT
 ATGTGGGGCACCTATGATGATGGTATTCGTGTGATTGAAAAAACGAGCTGGAACCTGGAACCCGGATATT
 CCGGTGCATATTCTGTTTCTGGGTGGCACCATTGGTAATTTTAGCAAACAGGATGGTGATGTGGCATTTC
 TGAAGGCCTGCCGCTGGATCATAAACGTGGTGATACCCTGCTGGTTGGTATGGATCGTCATAAAAGCG
 CAGATGCAATTGAACGTAGCTATGGTTTTGCAGCAGCAAAAGATTGGATTATGAATGGCCTGAAAGTTAG
 CGGTCGTGTTCTGACCGGTGATGAAGGTCTGTTTGAAATTGGCAATTGGGAACGCTATGCCAAATACAAT
 GAAGAACTGGGTCGTTATGAAGCCGGTTATAAAAGCCAGAAAGAACATGCACTGAAAATTAGCGAAGGT
 GTGGATATTACCTTCCTGAAAGATGAAGTGGTTCTGGTGATGTTGAGCAACAAATATACCGATGCAGAAA
 TGGATAGCGTTGTTGATAGCGCAGGTCTGGTTAAAAATGGTAGCTGGATGGATGAAAAAGCCCAGTATT
 GCCTGCTGAGCCTGCGTGCAAATAATGGTCCGGTTTAA

Figure S10. Codon-optimized cDNA sequence of the *Psilocybe serbica trpM* gene.

4 Unveröffentlichte Ergebnisse

4.1 Arbeiten an Indolalkaloiden aus *Psilocybe* spp. und *Amanita citrina*

Die Biosynthese des in *Psilocybe cubensis* vorkommenden Indolalkaloides Psilocybin wurde eingehend untersucht. Zu Beginn dieser Arbeit lag nur eine über Fütterungsversuche erstellte hypothetische Biosyntheseroute vor (Brack *et al.* 1961, Agurell und Nilsson 1968). Daher sollten native Proteine aus *P. cubensis*, welche putativ an der Biosynthese des Psilocybins beteiligt sind, aktivitätsgeleitet aufgereinigt und mittels Peptidanalytik identifiziert, heterolog produziert und charakterisiert werden. Zusätzliche Informationen zur Biosynthese des Psilocybins sollten über die genaue Untersuchung der Metabolome von *P. serbica* und *P. cubensis* erhalten werden. Weiterhin wurde die enzymatische Dephosphorylierung von Psilocybin und die enzymatische Oxidation von Psilocin und Bufotenin untersucht.

Bufotenin stellt ein Strukturisomer von Psilocin dar, welches sich von diesem durch die Lage seiner Hydroxylgruppe unterscheidet (Abb. 12). Aufgrund seiner Ähnlichkeit wurde es als weiteres Substrat zur Untersuchung der enzymatischen Oxidation von Psilocin verwendet. Auch ist bekannt, dass Bufotenin und Psilocin von identischen oxidativen Enzymen umgesetzt werden können, wobei die Umsatzgeschwindigkeit für Psilocin deutlich größer ist (Blaschko und Levine 1960b). Über den Vergleich der Reaktionsprodukte der Oxidationsreaktionen von Psilocin und Bufotenin erhoffte man Aussagen über den Mechanismus der Produktbildung.

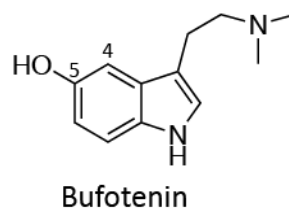


Abbildung 12: Strukturformel von Bufotenin. Von Psilocin unterscheidet sich Bufotenin durch die Hydroxylgruppe an der 5-Position während diese sich beim Psilocin an der 4-Position befindet (Vgl. Abb. 8 Molekül K).

4.1.1 Ergebnisse

Indolderivate aus *P. serbica* und *P. cubensis*

In den Kulturextrakten von *P. serbica* und *P. cubensis* konnten mittels UV-Vis Spektroskopie und Massenspektroskopie mehrere Indolderivate nachgewiesen werden. Zu diesen gehört auch das als Naturstoff neu beschriebene Norpsilocin (Lenz *et al.*, 2017). Die meisten Indolderivate waren allerdings nur in Spuren vorhanden, konnten aber anhand ihrer genauen Massen identifiziert werden. Wie aus Tab. 2 ersichtlich, konnte kein Dimethyltryptamin (Abb. 8, Molekül G) in Kulturextrakten nachgewiesen werden. Dies stellt zunächst die von Agurell und Nilsson vorgeschlagene Biosynthese des Psilocybins in Frage (Agurell und Nilsson 1968, siehe auch Abb. 8). Die Vielzahl der gefundenen Indolderivate würde andererseits die Theorie des von Laatsch vermuteten und oben erwähnten biosynthetischen Rasters der Psilocybinsynthese untermauern (Laatsch, 1998 siehe auch Kapitel 1.4.1).

Tab. 1: Im methanolischen Extrakt aus *Psilocybe serbica* mittels HPLC-HRMS nachgewiesene Indolalkaloide. Siehe auch Abb. 8.

Name	m/z	theoretische Masse	Δ (mmu)	Summenformel
Psilocybin (O)	285,09979	285,09987	-0,08	C ₁₂ H ₁₈ O ₄ N ₂ P
Psilocin (K)	205,13338	205,13354	-0,16	C ₁₂ H ₁₇ O N ₂
Norpsilocin (J)	191,1179	191,11789	0,01	C ₁₁ H ₁₅ O N ₂
Tryptophan (A)	205,09766	205,09715	0,51	C ₁₁ H ₁₃ O ₂ N ₂
Methyltryptophan (B)	219,11246	219,1128	-0,34	C ₁₂ H ₁₅ O ₂ N ₂
Dimethyltryptophan (C)	233,12875	233,12845	0,3	C ₁₃ H ₁₇ O ₂ N ₂
4-OH Tryptophan (H)	221,09206	221,09207	-0,01	C ₁₁ H ₁₃ O ₃ N ₂
4-OH Tryptamin (I)	177,10229	177,10224	0,05	C ₁₀ H ₁₃ O N ₂

Tab.2: Im methanolischen Extrakt aus *Psilocybe cubensis* mittels HPLC-HRMS nachgewiesene Indolalkaloide

Name	m/z	theoretische Masse	Δ (mmu)	Summenformel
Psilocybin (O)	285,0994	285,09956	-0,16	C ₁₂ H ₁₈ O ₄ N ₂ P
Psilocin (K)	205,13336	205,13354	-0,18	C ₁₂ H ₁₇ O N ₂
Norpsilocin (J)	191,11787	191,11789	-0,02	C ₁₁ H ₁₅ O N ₂
Tryptophan (A)	205,09708	205,09715	-0,07	C ₁₁ H ₁₃ O ₂ N ₂
Methyltryptophan (B)	219,11266	219,1128	-0,14	C ₁₂ H ₁₅ O ₂ N ₂
Baeocystin (N)	271,08395	271,08422	-0,27	C ₁₁ H ₁₆ O ₄ N ₂ P

Inhaltsstoffe aus *Amanita citrina*

Im methanolischen Extrakt der Fruchtkörper von *Amanita citrina* konnte Bufotenin über seine Masse und sein UV-Absorptionsspektrum identifiziert werden (Abb 13). Bufotenin wurde aus dem Rohextrakt aufgereinigt, um in späteren Enzymassays verwendet zu werden. Man erhielt insgesamt ca. 30 mg Bufotenin (siehe Methoden Kapitel 4.1.2).

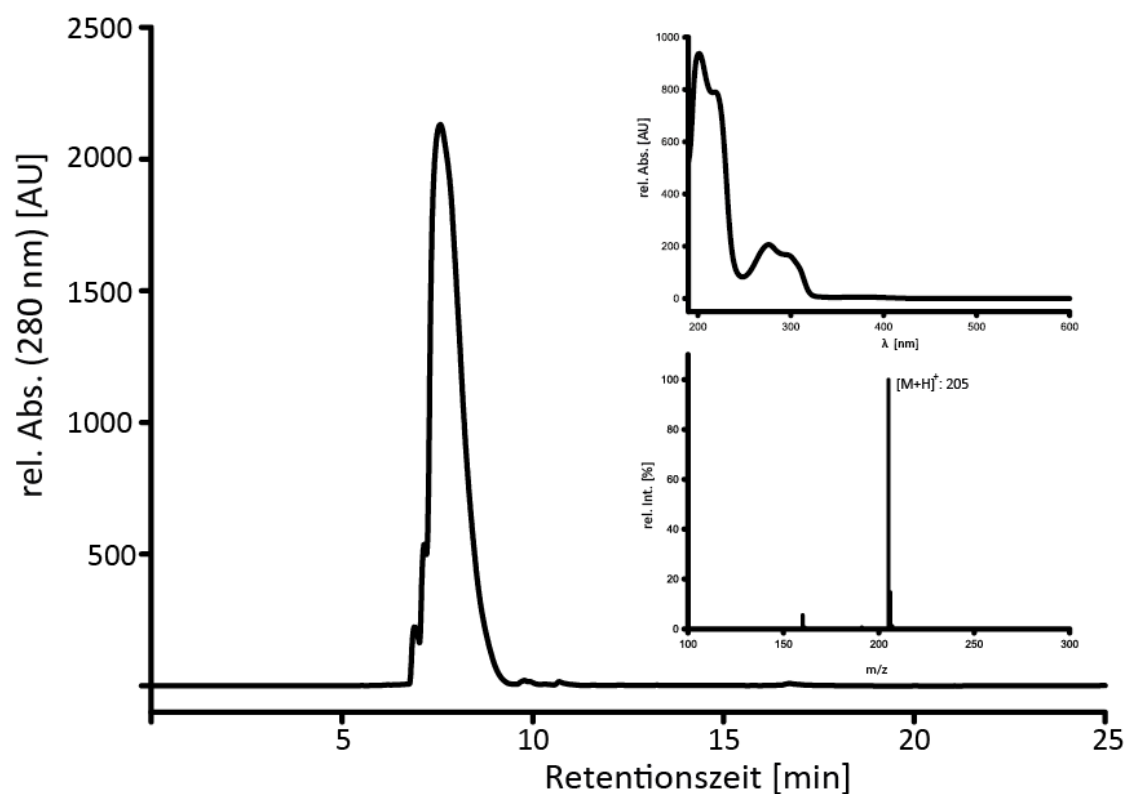


Abbildung 13: HPLC-Profil, UV-Vis-Spektrum und Massenspektrum von gereinigtem Bufotenin aus *Amanita citrina*.

Reinigung und *in-vitro* Produktbildungsassays mit nativem Protein

Die FPLC-Läufe zur Reinigung nativen Proteins aus *P. cubensis* waren reproduzierbar. Konnte eine Fraktion mittels *in-vitro*-Produktbildungsassay als aktiv identifiziert werden, so galt dies auch für die Fraktionen späterer FPLC-Läufe.

Wie auch bei Agurell und Nilsson 1968 wurde angenommen, dass an der Biosynthese des Psilocybins eine Decarboxylase, eine Methyltransferase, eine Kinase und eine Oxidase beteiligt sind. Auch in Bezug auf die Bildung des blauen Farbstoffes gab es Hinweise auf die Beteiligung einer Phosphatase und einer Cytochrom- oder Kupferoxidase (Levine 1967). Im Rahmen dieser Arbeit wurde im nativen Proteom von *P. cubensis* nach einer Tryptophandecarboxylase und einer Psilocinkinase sowie einer Psilocybinphosphatase und einer Psilocinoxidase gesucht. Proteinextrakte von *P. cubensis* wurden daher mittels FPLC (Fast protein liquid chromatography, Proteinflüssigchromatographie) nacheinander über drei verschiedene Säulen gereinigt: Anionenaustauschchromatographie (IEX), Hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) und Größenausschlusschromatographie (SEC).

Zur Identifizierung aktiver Proteinfractionen zur Reinigung der verschiedenen Biosyntheseenzyme wurden enzymatische Produktbildungsassays durchgeführt. Diese wurden mittels HPLC-MS auf einen Eduktumsatz hin ausgewertet (siehe Methoden, Kapitel 4.1.2). Die hier gezeigten Ergebnisse entsprechen Assays mit nativem Protein der SEC-Fraktion aus *P. cubensis*. Die nachfolgenden HPLC-Profile entsprechen denen der Enzymassays der Proteinfraktion mit dem höchsten Umsatz. Diese Fraktionen wurden anschließend weiterbearbeitet. Als Kontrollen dienen hier die Assays mit den Fraktionen, welche je nach Trennleistung im SEC-Lauf kaum/kein aktives Protein enthalten. Daher ist in den Kontrollen bisweilen dennoch ein leichter Umsatz zu erkennen.

Reinigung und Enzymassay der Decarboxylase

Die nach dem IEX-Lauf erhaltene Fraktion mit der höchsten Decarboxylaseaktivität (Abb. 14) wurde weiter über HIC und anschließend über SEC gereinigt (Abb. 15, Abb. 16). Die aktive Fraktion aus dem SEC-Lauf wurde nach Identifizierung über den Decarboxylaseassay weiter mittels Peptidanalytik untersucht.

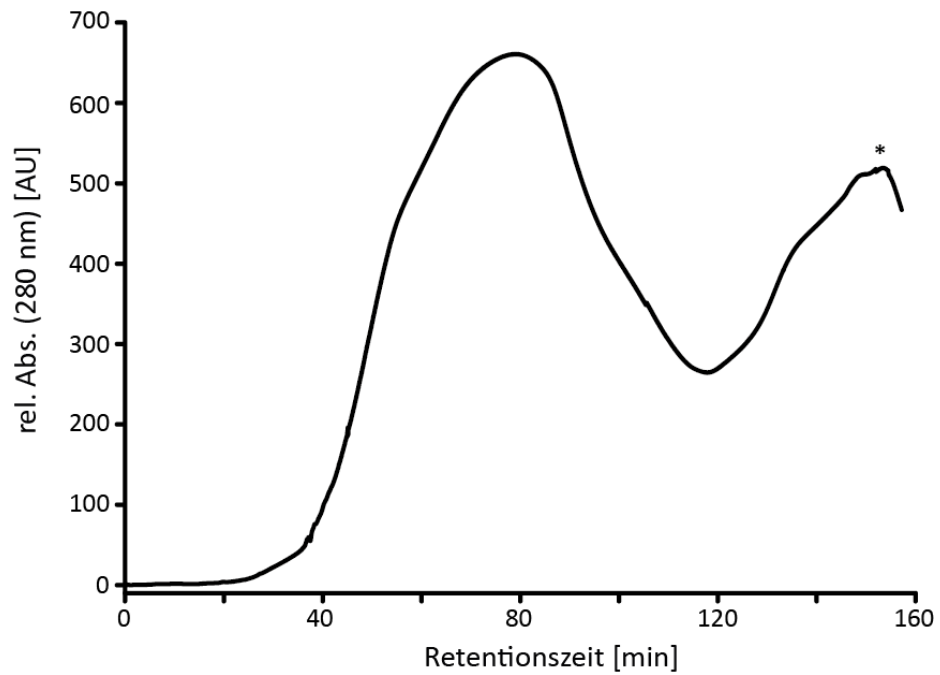


Abbildung 14: FPLC-Profil des IEX-Laufes zur Reinigung der nativen Decarboxylase aus *P. cubensis*. Die Fraktion mit der höchsten Decarboxylaseaktivität ist mit einem Stern gekennzeichnet.

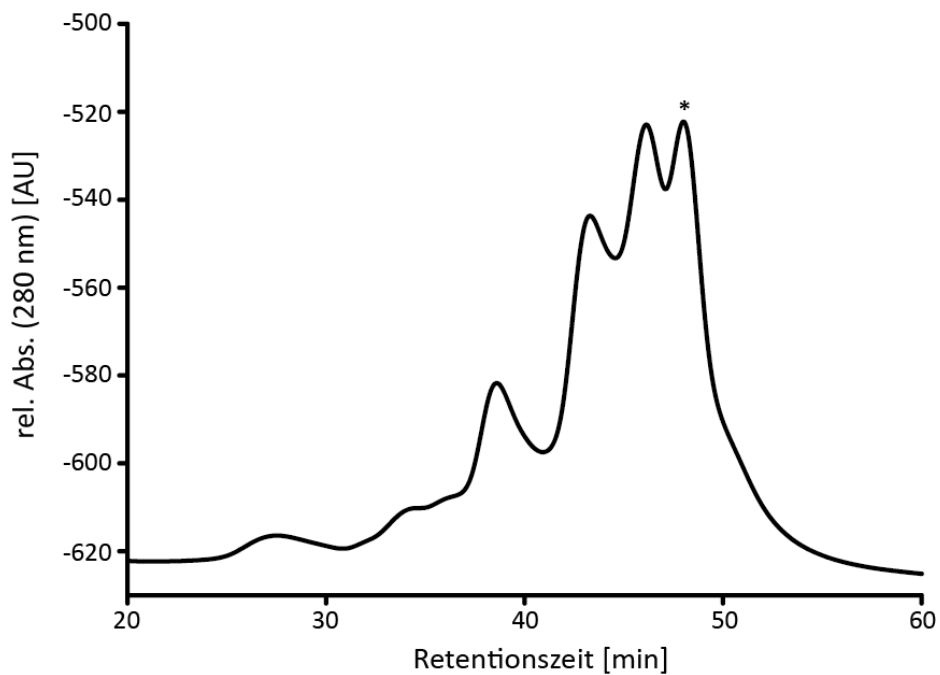


Abbildung 15: FPLC-Profil des HIC-Laufes zur Reinigung der nativen Decarboxylase aus *P. cubensis*. Die Fraktion mit der höchsten Decarboxylaseaktivität ist mit einem Stern gekennzeichnet. Aufgrund der häufig auftretenden, fehlerhaften Kalibrierung der Absorption sind deren Werte im negativen Bereich.

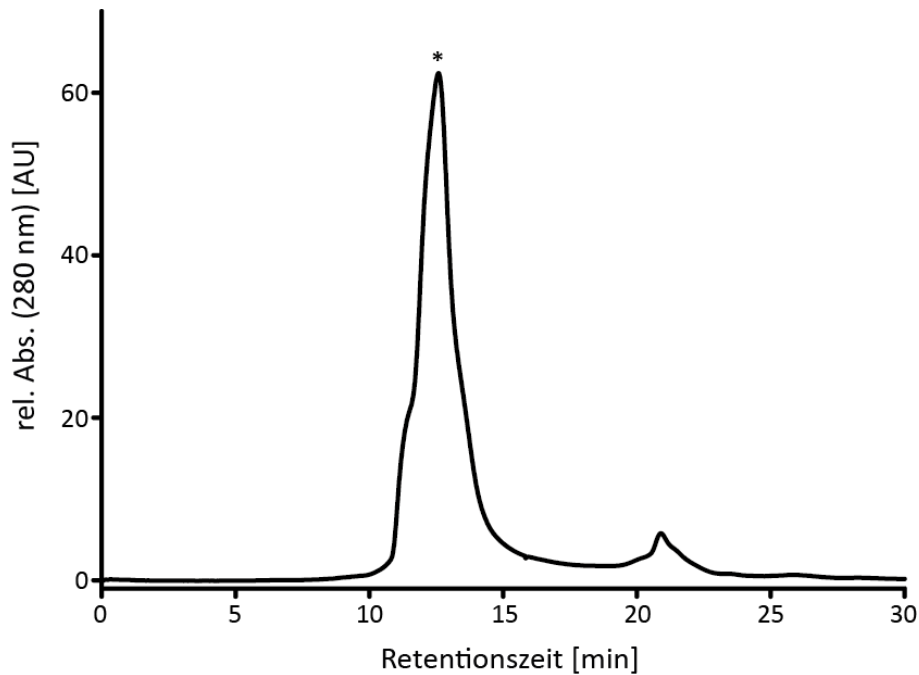


Abbildung 16: FPLC-Profil des SEC-Laufes zur Reinigung der nativen Decarboxylase aus *P. cubensis*. Die Fraktion mit der höchsten Decarboxylaseaktivität ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Im Decarboxylaseassay mit nativem Protein konnte nach 18 h Inkubationszeit ein deutlicher Umsatz von L-Tryptophan zu Tryptamin beobachtet werden (Abb.17, Abb. 18).

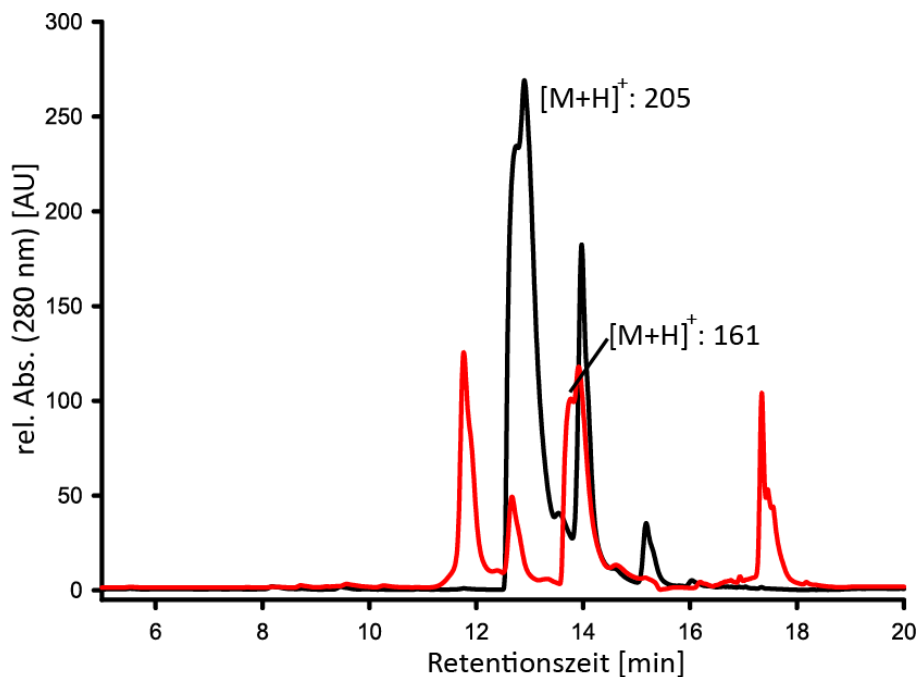


Abbildung 17: HPLC-Profil des Assayextraktes des Decarboxylaseassays. Im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) kann in der Probe (rot) kein Tryptophan (RT 13,0 min, $[M+H]^+$: 205), dafür ein neuer Peak bei 14,0 min beobachtet werden, dessen Masse mit der des Tryptamins ($[M+H]^+$: 161) übereinstimmt. Die Massendifferenz ergibt sich aus der enzymatischen Abspaltung von CO_2 des Tryptophans.

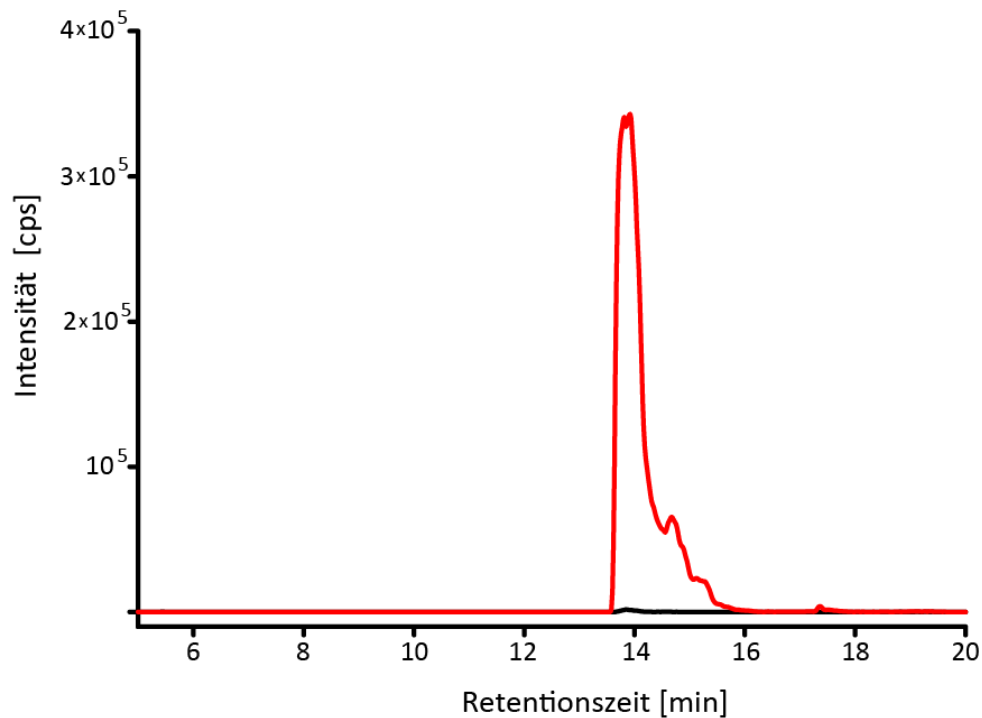


Abbildung 18: Massenspurprofil (m/z : 160,3 – 161,7) des Assayextraktes des Decarboxylaseassays. Im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) kann in der Probe (rot) ein neuer Peak bei 14,0 min beobachtet werden.

Peptidanalytik der Decarboxylase

Nach tryptischem Verdau der gereinigten, nativen Proteinfraction mit Decarboxylaseaktivität und anschließender Peptidanalytik konnte in der Proteindatenbank ANID ein aussichtsreicher Kandidat für eine Decarboxylase gefunden werden (siehe Kapitel 4.1.2 „Erstellen der Proteindatenbanken“; Sequenz siehe Anhang). BLAST-Alignments zeigten Ähnlichkeiten zu putativen pyridoxalphosphat (PLP) -abhängigen Transferasen aus Basidiomyceten (*Sanghuangporus baumii* 52 % übereinstimmende Aminosäuren; *Schizopora paradoxa* 48 % übereinstimmende Aminosäuren) und putativen PLP-abhängigen Decarboxylasen (*Calocera cornea* 47 %, *Rhizoctonia solani*; 45 % übereinstimmende Aminosäuren). Größte Übereinstimmung bestand zu einem hypothetischen Protein aus *Psilocybe cyanescens* mit 76 % übereinstimmender Aminosäuren.

Zu der Tryptophandecarboxylase PsiD aus *P. cubensis*, welche an der Biosynthese des Psilocybins beteiligt ist, ergibt sich nur ein Prozentsatz übereinstimmender Aminosäuren von 7 % (Fricke *et al.* 2017). Zu der charakterisierten PLP-abhängigen L-Tryptophan Decarboxylase aus CsTDC aus *Ceriporiopsis subvermispora*, besteht eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von 30 % (Kalb *et al.* 2016). Insgesamt ist die Datenlage für

charakterisierte Decarboxylasen aus Basidiomyceten jedoch zu dürftig, um die hier gefundene Tryptophandecarboxylase genauer einzuordnen.

Tab. 3: Putative Decarboxylase mit Angabe zum Fundort der codierenden Sequenz, der Datenbank, in welcher diese gefunden wurden, sowie zur Anzahl der Peptidfragmente, welche durch die Peptidanalytik eine Übereinstimmung mit theoretisch berechneten Fragmenten ergaben. Die Peptidanalytik erfolgte in Kooperation mit Dr. Daniel Braga de Lima am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Jena.

Name	Ort im Genom	Datenbanken	Peptidfragmente
TDC	NODE_1704_ g203.t1	ANID	9

Reinigung und Enzymassay der Kinase

Die nach dem IEX-Lauf erhaltene Fraktion mit der höchsten Kinaseaktivität (Abb. 19) wurde weiter über HIC und anschließend über SEC gereinigt (Abb. 20, Abb. 21). Die aktive Fraktion aus dem SEC-Lauf wurde nach Identifizierung über den Kinaseassay weiter mittels Peptidanalytik untersucht.

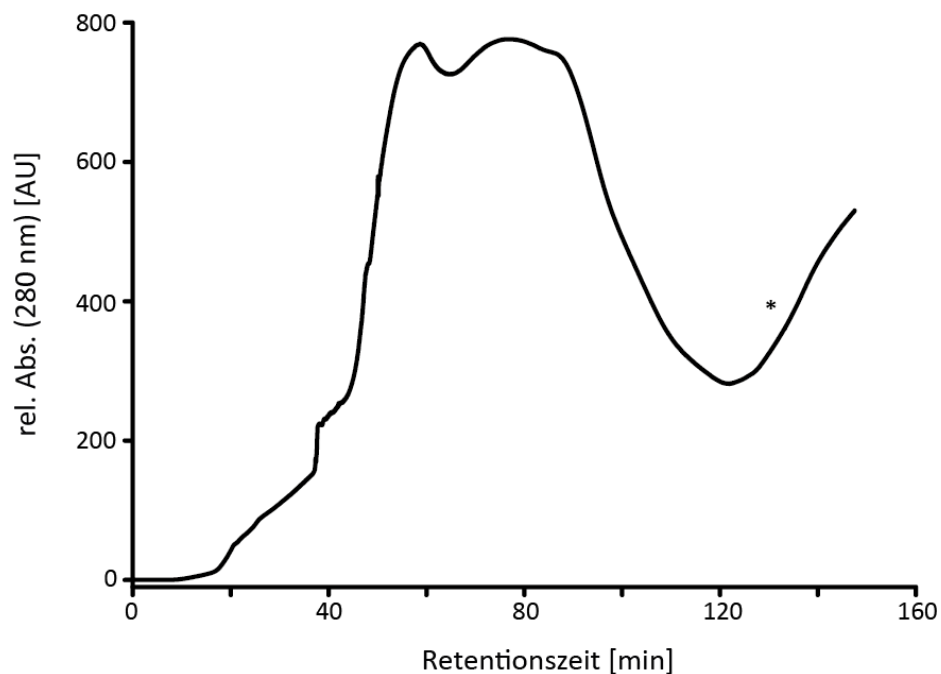


Abbildung 19: FPLC-Profil des IEX-Laufes zur Reinigung der nativen Kinase aus *P. cubensis*. Die Fraktion mit der höchsten Kinaseaktivität ist mit einem Stern gekennzeichnet.

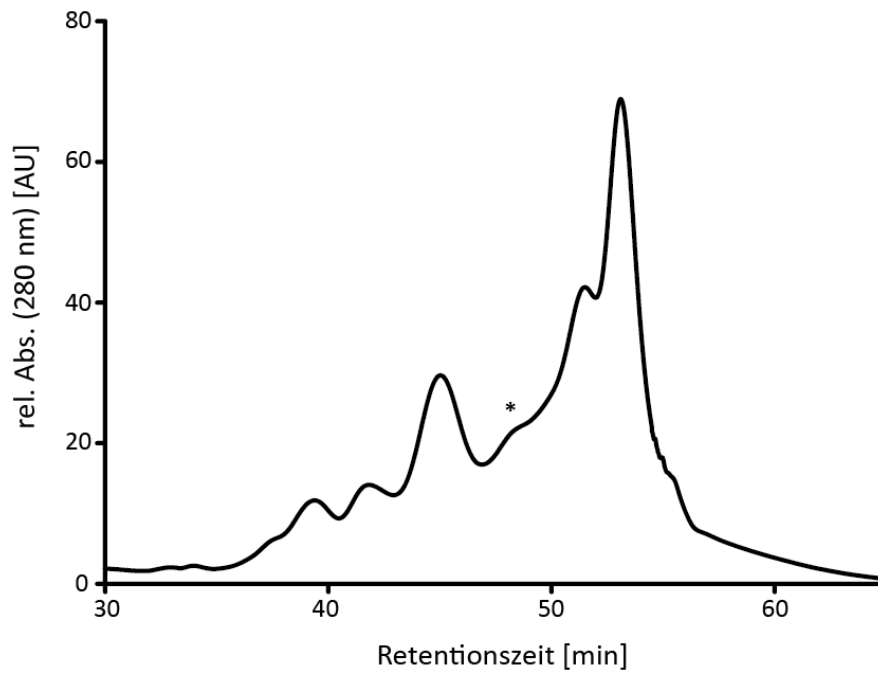


Abbildung 20: FPLC-Profil des HIC-Laufes zur Reinigung der nativen Kinase aus *P. cubensis*. Die Fraktion mit der höchsten Kinaseaktivität ist mit einem Stern gekennzeichnet.

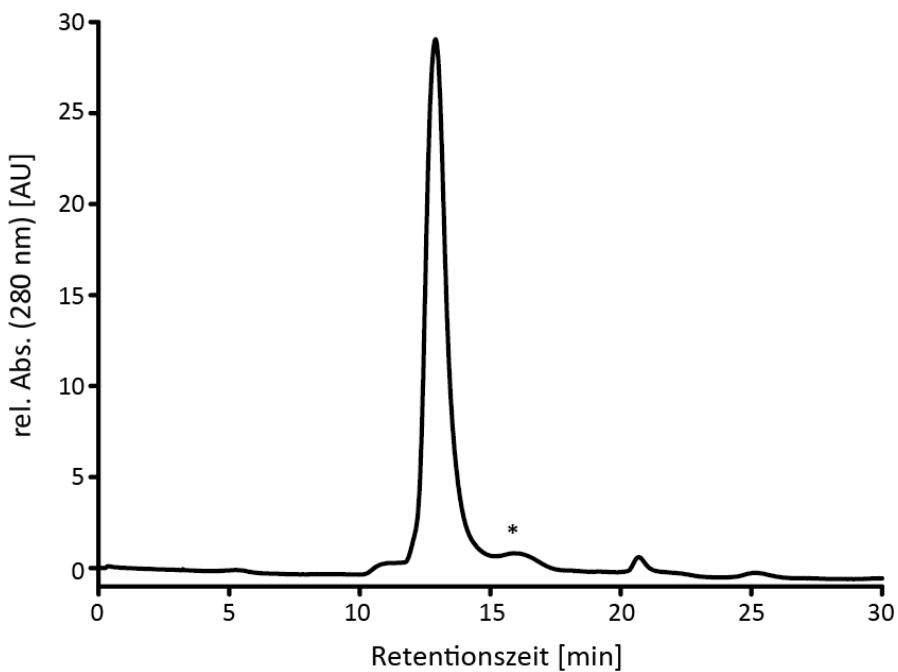


Abbildung 21: FPLC-Profil des SEC-Laufes zur Reinigung der nativen Kinase aus *P. cubensis*. Die Fraktion mit der höchsten Kinaseaktivität ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Im Kinaseassay mit nativem Protein konnte ein leichter Umsatz von Psilocin zu Psilocybin von ca. 5 % beobachtet werden (Abb. 22).

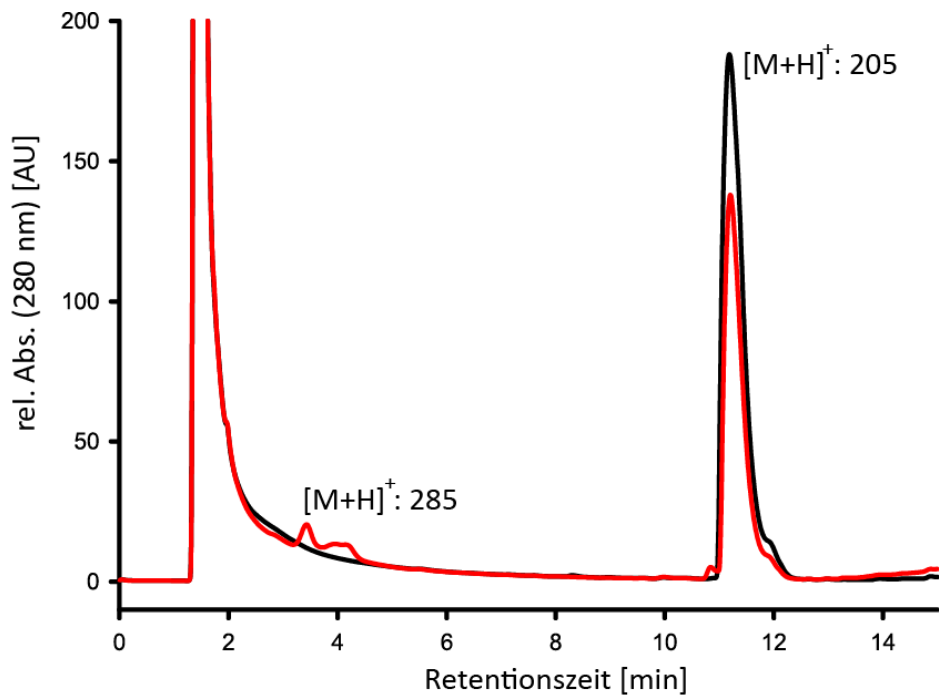


Abbildung 22: HPLC-Profil des Assayextraktes des Kinaseassays. Im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) kann in der Probe (rot) eine Abnahme von Psilocin (RT 11,2 min, $[M+H]^+$: 205) und die leichte Bildung von Psilocybin (RT 3,4 min $[M+H]^+$: 285) beobachtet werden. Die Massenzunahme entspricht genau der enzymatisch zugefügten Phosphatgruppe zu dem Psilocin. Der ohne Standardkurven schwer zu quantifizierende Umsatz lag allein durch Beurteilung durch die Peakflächen bei ca. 5 %.

Peptidanalytik der Kinase

Nach tryptischem Verdau der gereinigten, nativen Proteinfraction mit Kinaseaktivität und anschließender Peptidanalytik konnten in allen Proteindatenbanken (ANID, LBIC, PCHR, CCIN; siehe Kapitel 4.1.2) putative Psilocinkinasen gefunden werden. Schlussendlich wurden vier Kandidaten weiterbearbeitet. Diese wurden nach den Proteinen benannt, denen sie im BLAST-Alignementergebnis am ähnlichsten waren.

Der Glucosaminkinase-Kandidat erhielt seinen Namen aufgrund seiner Ähnlichkeit zu putativen Glucosaminkinasen. Eine gewisse Ähnlichkeit besteht zu einer N-acetyl-D-glucosaminkinase aus *Hypsizygus marmoreus* und einer solchen aus *Leucoagaricus sp.* mit einem Prozentsatz übereinstimmender Aminosäuren von 57 % bzw. 54 %. Die größte Ähnlichkeit besteht zu einem hypothetischen Protein aus *P. cyanescens* mit 80 %.

Der Adenosinkinasekandidat erhielt seinen Namen aufgrund seiner Ähnlichkeit zu putativen Adenosinkinasen u.a. aus *Coprinopsis cinerea* und *Lentinula edodes* mit einem Prozentsatz

übereinstimmender Aminosäuren von 74 % bzw. 70 %. Mit einem hypothetischen Protein aus *P. cyaneus* stimmen 78 % der Aminosäuren überein.

Der MurG/FolC-Kandidat erhielt seinen Namen aufgrund seiner Ähnlichkeit zu putativen Enzymen, welche für die Folylpolyglutamatsynthese zuständig ist oder Enzymen, welche putative Muramyligasen darstellen. So ähnelt dieser Kandidat einer Folylpolyglutamatsynthase aus *Moniliophthora roreri* mit einem Prozentsatz übereinstimmender Aminosäuren von 53 % und einer Muramylgase aus *Trametes coccinea* mit einem Prozentsatz übereinstimmender Aminosäuren von ebenfalls 53 %. Die größte Übereinstimmung von 66 % ergibt sich mit einem hypothetischen Protein aus *P. cyaneus*.

Der ThiD-Kandidat erhielt seinen Namen aufgrund seiner Ähnlichkeit zu putativen Enzymen, welche an der Thiamin-Biosynthese beteiligt sind. ThiD katalysiert dabei den ATP-abhängigen Umsatz von Hydroxymethylpyrimidinphosphat zu Hydroxymethylpyrimidinpyrophosphat (Du, 2011). So liegt der Prozentsatz übereinstimmender Aminosäuren bei 70 % bzw. 67 % zu je einem Thiaminbiosynthese-Protein aus *Coprinopsis cinerea* und aus *Armillaria ostoyae*. Die größte Übereinstimmung besteht zu einem hypothetischen Protein aus *Psilocybe cyanescens* mit 86 % übereinstimmender Aminosäuren.

Tab. 4: Putative Psilocinkinasen mit Angabe zum Fundort der codierenden Sequenz, der Datenbank, in der sie gefunden wurden, sowie zur Anzahl der Peptidfragmente, welche durch die Peptidanalytik eine Übereinstimmung mit theoretisch berechneten Fragmenten ergaben. Die Peptidanalytik erfolgte in Kooperation mit Dr. Daniel Braga de Lima am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Jena.

Name	Ort im Genom	Datenbanken	Peptidfragmente
Glucosaminkinase	NODE_6694_g1458.t1	ANID, LBIC, PCHR	1/1/1
Adenosinkinase	NODE_5658_g928.t1	ANID, LBIC, CCIN	12/9/9
MurG/FolC	NODE_9255_g620.t1	ANID, LBIC, PCHR, CCIN	2/2/2/2
ThiD	NODE_1982_g701.t2	PCHR	1

Reinigung und Enzymassay der Phosphatase

Die nach dem IEX-Lauf erhaltene Fraktion mit der höchsten Phosphataseaktivität (Abb. 23) wurde weiter über HIC und anschließend über SEC gereinigt (Abb. 24, Abb. 25). Die aktive Fraktion aus dem SEC-Lauf wurde nach Identifizierung über den Phosphataseassay weiter mittels Peptidanalytik untersucht.

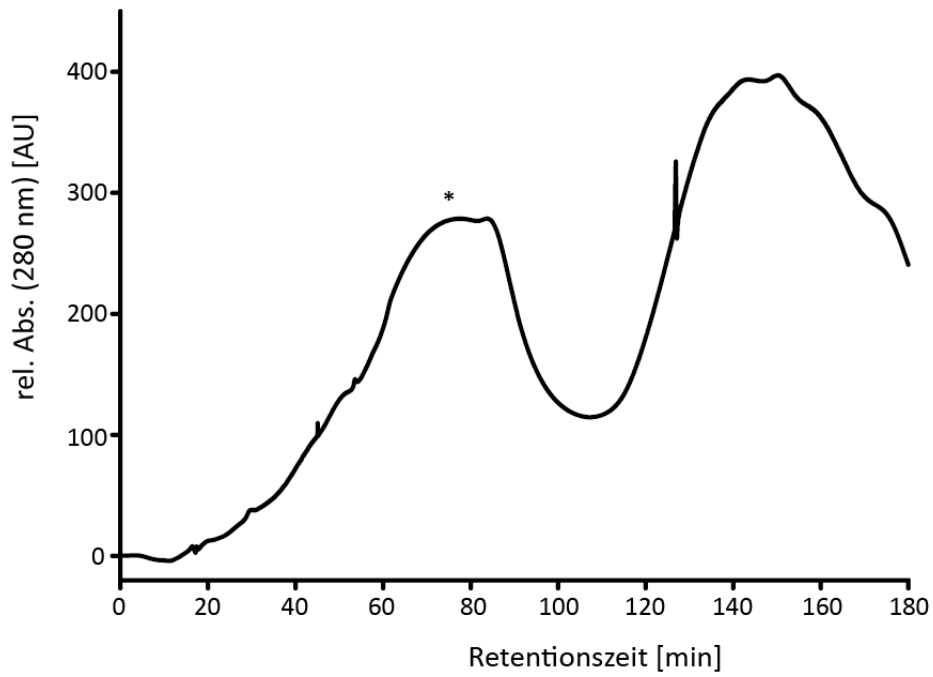


Abbildung 23: FPLC-Profil des IEX-Laufes zur Reinigung der nativen Phosphatase aus *P. cubensis*. Die Fraktion mit der höchsten Kinaseaktivität ist mit einem Stern gekennzeichnet.

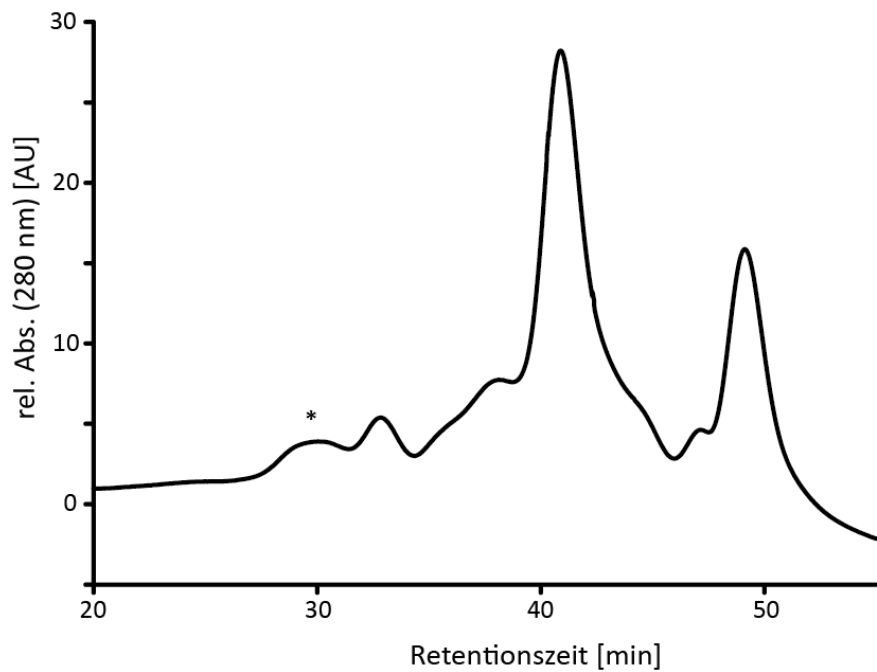


Abbildung 24: FPLC-Profil des HIC-Laufes zur Reinigung der nativen Phosphatase aus *P. cubensis*. Die Fraktion mit der höchsten Phosphataseaktivität ist mit einem Stern gekennzeichnet.

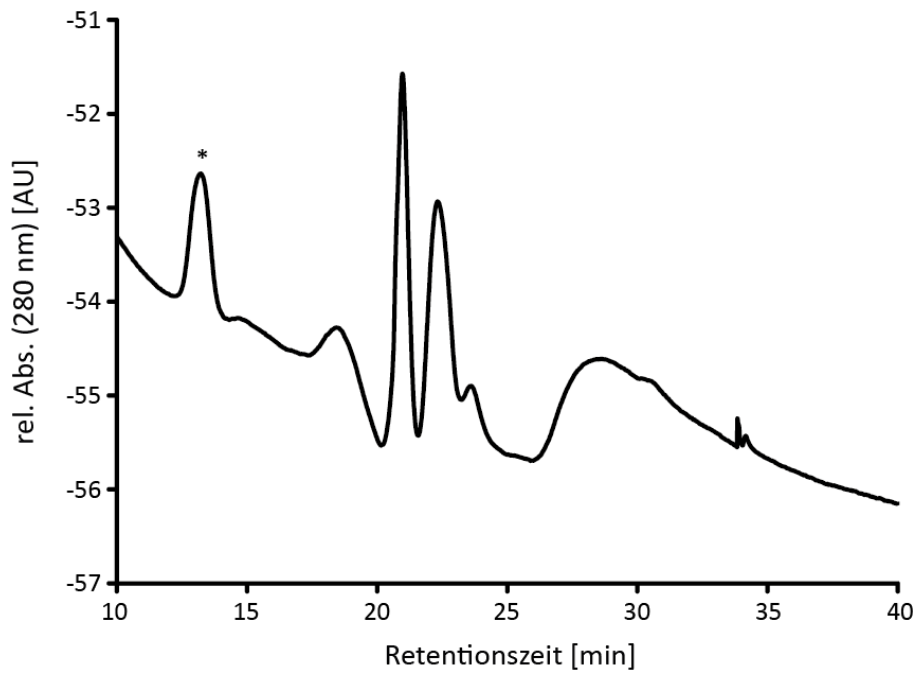


Abbildung 25: FPLC-Profil des SEC-Laufes zur Reinigung der nativen Phosphatase aus *P. cubensis*. Die Fraktion mit der höchsten Phosphataseaktivität ist mit einem Stern gekennzeichnet. Aufgrund der häufig auftretenden, fehlerhaften Kalibrierung der Absorption sind deren Werte im negativen Bereich.

Im Phosphataseassay mit nativem Protein konnte innerhalb von 30 s ein deutlicher Umsatz von Psilocybin zu Psilocin beobachtet werden (Abb. 26).

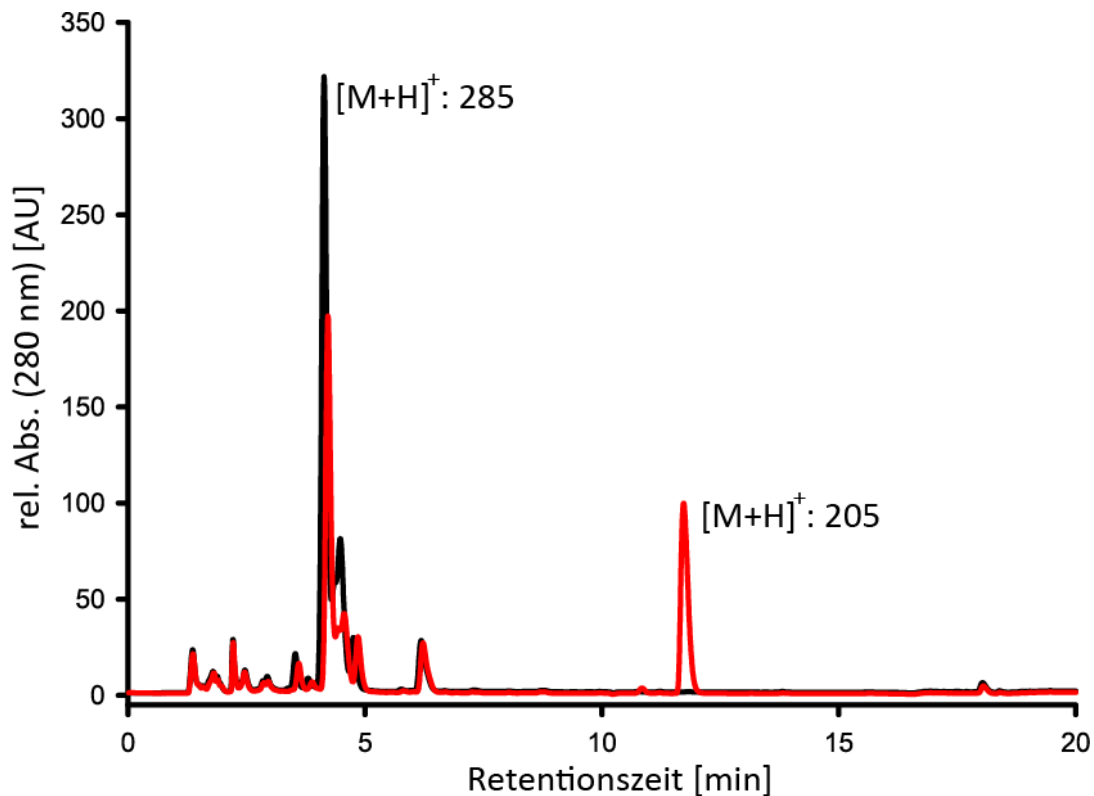


Abbildung 26: HPLC-Profil des Assayextraktes des Phosphataseassays. Im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) kann in der Probe (rot) eine starke Abnahme von Psilocybin (RT 4,2 min, $[M+H]^+$: 285) und die Bildung von Psilocin (RT 11,7 min, $[M+H]^+$: 205) beobachtet werden. Die Massendifferenz ergibt sich aus der enzymatischen Abspaltung einer Phosphatgruppe von Psilocybin.

Peptidanalytik der Phosphatase

Nach tryptischem Verdau der gereinigten, nativen Proteinfraction mit Phosphataseaktivität und anschließender Peptidanalytik konnten in der ANID-Proteindatenbank (siehe Methoden, Kapitel 4.1.2) zwei putative Psilocybinphosphatasen gefunden werden. Diese sind sich recht ähnlich und teilen 47 % aller Aminosäuren, wie ein BLAST-Alignment zeigte. Die codierende Sequenz für Phos1, *phos1*, wird von neun Introns unterbrochen und hat eine Länge von 1659 Basenpaaren. Phos1 hat, bestehend aus 552 Aminosäuren, eine Masse von 59 Kilodalton. Die codierende Sequenz *phos2* wird von zwölf Introns unterbrochen und hat eine Länge von 1962 Basenpaaren. Phos2 hat, bestehend aus 655 Aminosäuren, eine Masse von 73 Kilodalton. Phos1 zeigt u.a. Ähnlichkeit zu einer putativen Phosphoglyceratmutase aus *Punctularia strigosozonata* und zu einer 3-Phytase aus *Leucoagaricus* spp. mit 67 % bzw 60 % übereinstimmenden Aminosäuren. Auch Phos2 ähnelt u.a. einer 3-Phytase aus *Hypsizygus marmoreus* und einer Phytase aus *Laccaria bicolor* mit 67% bzw. 75 % übereinstimmender Aminosäuren. Sowohl Phos1 als auch Phos2 zeigen die höchste Übereinstimmung zu je einem

nicht identischen hypothetischen Protein aus *P. cyanescens* mit 86 bzw. 88 % übereinstimmender Aminosäuren. Des Weiteren liegt eine hohe Übereinstimmung in der Aminosäureabfolge zu hypothetischen Proteinen aus den psilocybinproduzierenden Pilzen *Psilocybe serbica*, *Gymnopilus dilepis* und *Panaeolus cyanescens* mit 83 %, 69 % und 65 % (Phos1) und 83 %, 73 % und 72 % (Phos2) vor (Reynolds *et al.* 2018, Fricke *et al.* 2017). Alignments der Proteinsequenzen von Phos1 mit Phos2 und den hypothetischen Proteinen hoher Übereinstimmung zu Phos1 aus *Psilocybe serbica* (*Pser*), *Psilocybe cyanescens* (*Pcya*), *Gymnopilus dilepis* (*Gdil*) und *Panaeolus cyanescens* (*PaCy*) wurden mittels des von Clustal Omega bereitgestellten Algorithmus erstellt. Das Alignment ist im Anhang einzusehen.

Während Phosphoglyceratmutasen die Umlagerung einer Phosphatgruppe innerhalb eines Moleküles katalysieren, setzen Phytasen Phosphat aus Phytinsäure frei. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu Phytasen wurden die für Phos1 und Phos2 codierenden Sequenzen zunächst *phy1* und *phy2* genannt (siehe Kapitel 4.1.2, Tab. 14 und Tab. 16).

Tab. 5: Putative Phosphatasen mit Angabe zum Fundort der codierenden Sequenz, der Datenbank, in welcher diese gefunden wurden, sowie zur Anzahl der Peptidfragmente, welche durch die Peptidanalytik eine Übereinstimmung mit theoretisch berechneten Fragmenten ergaben. Die Peptidanalytik erfolgte in Kooperation mit Dr. Daniel Braga de Lima am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Jena.

Name	Ort im Genom	Datenbanken	Peptidfragmente
Phos1	NODE_5188_g116.t1	ANID	13
Phos2	NODE_1982_g785.t1	ANID	4

Reinigung und Enzymassay der Laccase

Die nach dem IEX-Lauf erhaltene Fraktion mit der höchsten Laccaseaktivität (Abb. 27) wurde weiter über HIC und anschließend über SEC gereinigt (Abb. 28, Abb. 29). Die aktive Fraktion aus dem SEC-Lauf wurde nach Identifizierung über den Laccaseassay weiter mittels Peptidanalytik untersucht.

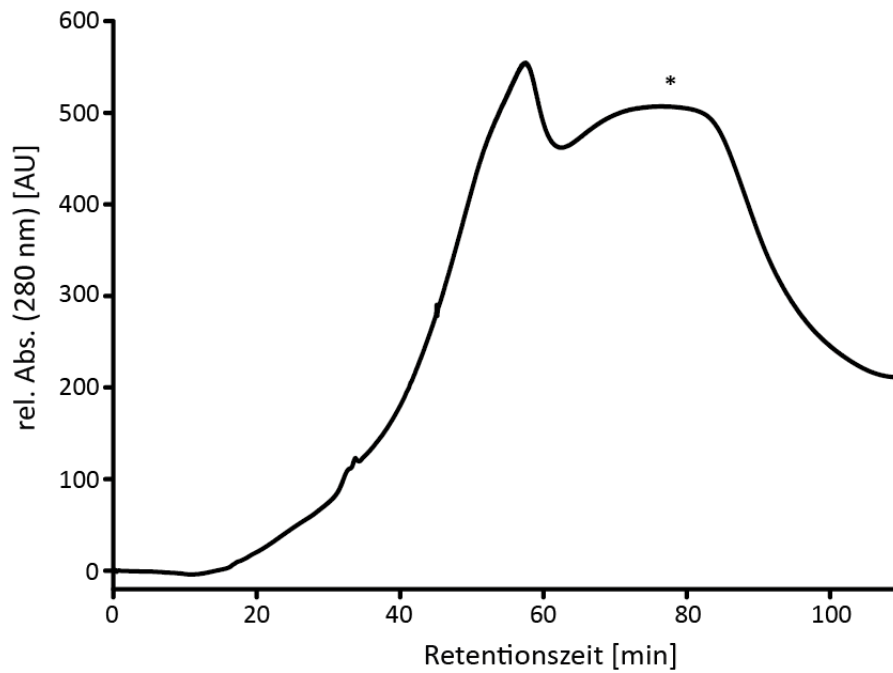


Abbildung 27: FPLC-Profil des IEX-Laufes zur Reinigung der nativen Laccase aus *P. cubensis*. Die Fraktion mit der höchsten Laccaseaktivität ist mit einem Stern gekennzeichnet.

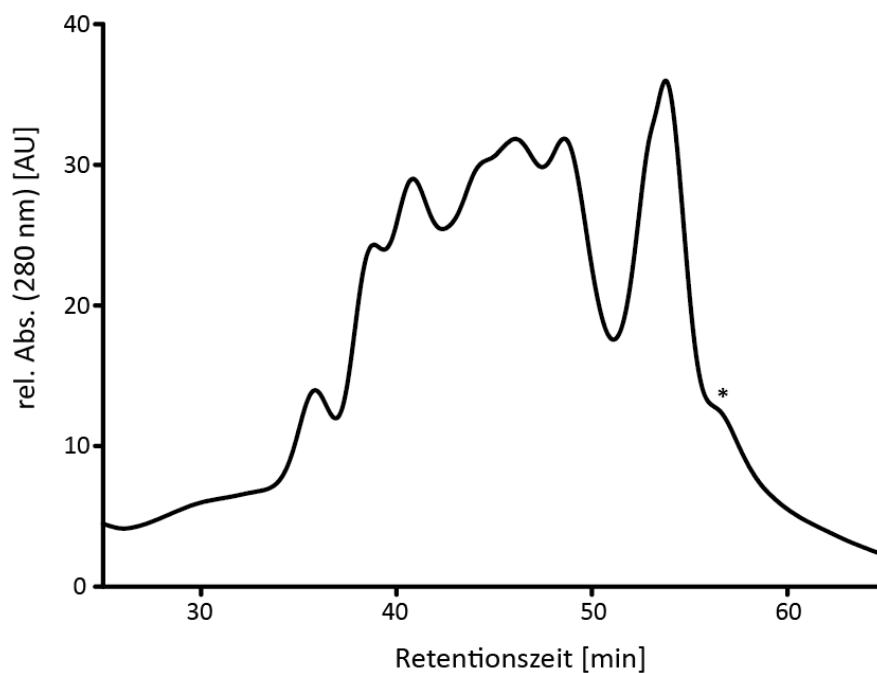


Abbildung 28: FPLC-Profil des HIC-Laufes zur Reinigung der nativen Laccase aus *P. cubensis*. Die Fraktion mit der höchsten Laccaseaktivität ist mit einem Stern gekennzeichnet.

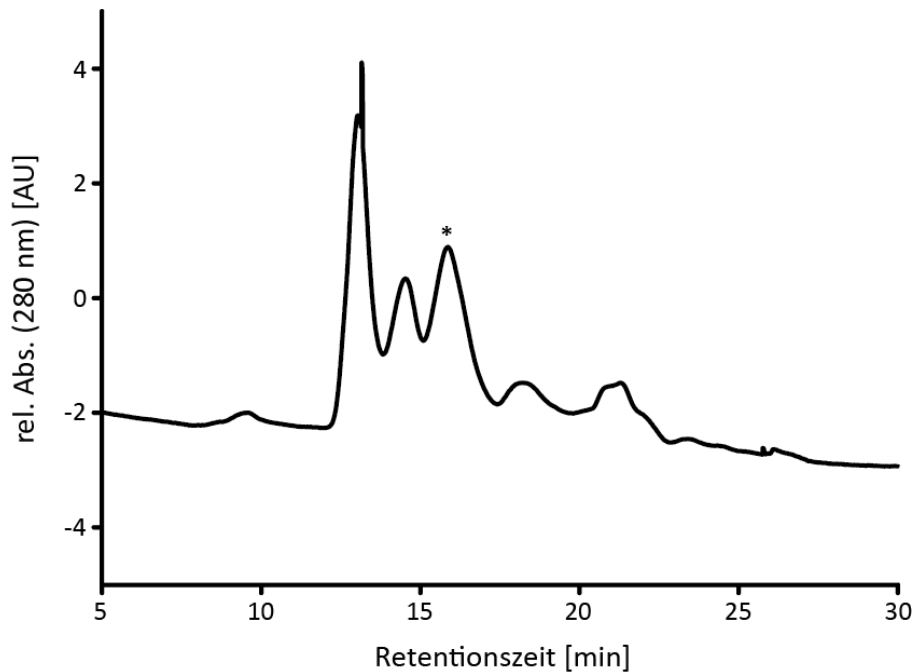


Abbildung 29: FPLC-Profil des SEC-Laufes zur Reinigung der nativen Laccase aus *P. cubensis*. Die Fraktion mit der höchsten Laccaseaktivität ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Im Laccaseassay mit nativem Protein wurde innerhalb von 15 min das gesamte im Assay vorhandene Psilocin umgesetzt (Abb. 30). In Extrakten der Enzymassays konnte kein Reaktionsprodukt mittels HPLC-MS nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass der gebildete blaue Farbstoff proteinbindende Eigenschaften hat und schwer in Lösung zu bringen ist, was eine Detektion erschwert (Levine 1967). Im Gegensatz dazu wurde Bufotenin zu einem mittels HPLC-MS detektierbaren Produkt umgesetzt, wahrscheinlich einem Bufotenindimer (Abb. 31). Die verschiedene Detektierbarkeit, vermutlich auf Strukturabweichungen der Reaktionsprodukte beruhend, scheint allein in dem leichten, isomeren Unterschied zwischen Psilocin und Bufotenin zu liegen (siehe Abb. 12, Strukturvorschläge für mögliche Reaktionsprodukte siehe Abb. 37 und Abb. 38).

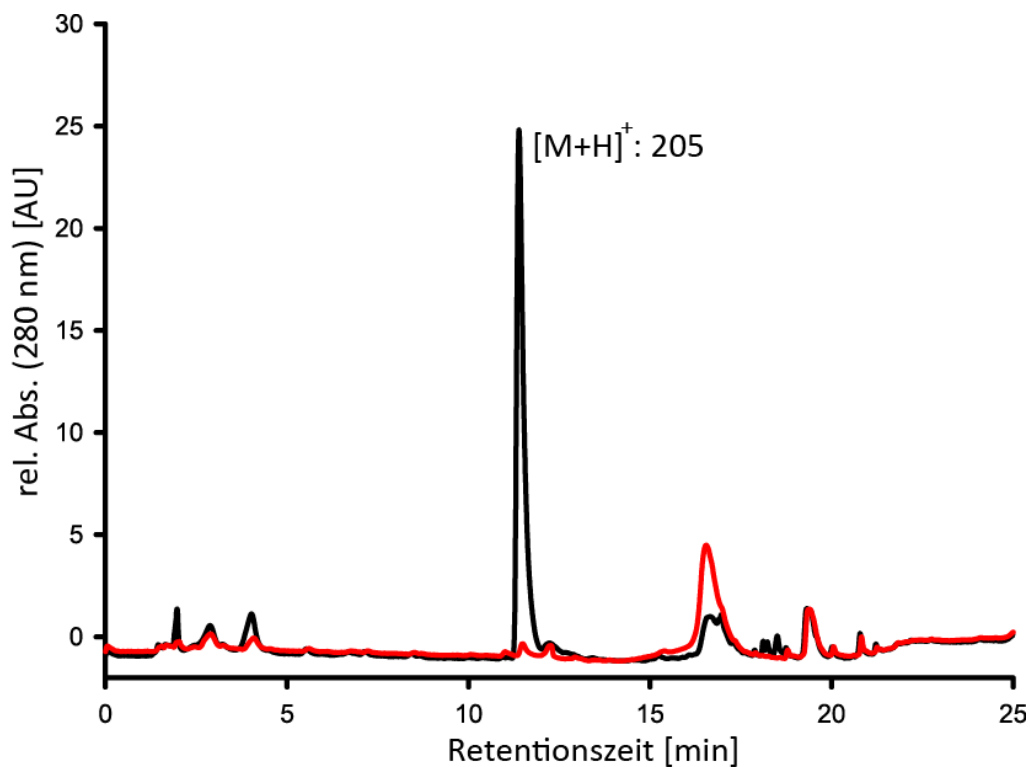


Abbildung 30: HPLC-Profil des Assayextraktes des Laccaseassays. Im Vergleich zur Probe (rot) kann in der Kontrolle (schwarz) kein Psilocin (RT 11,8, $[M+H]^+$: 205) mehr beobachtet werden.

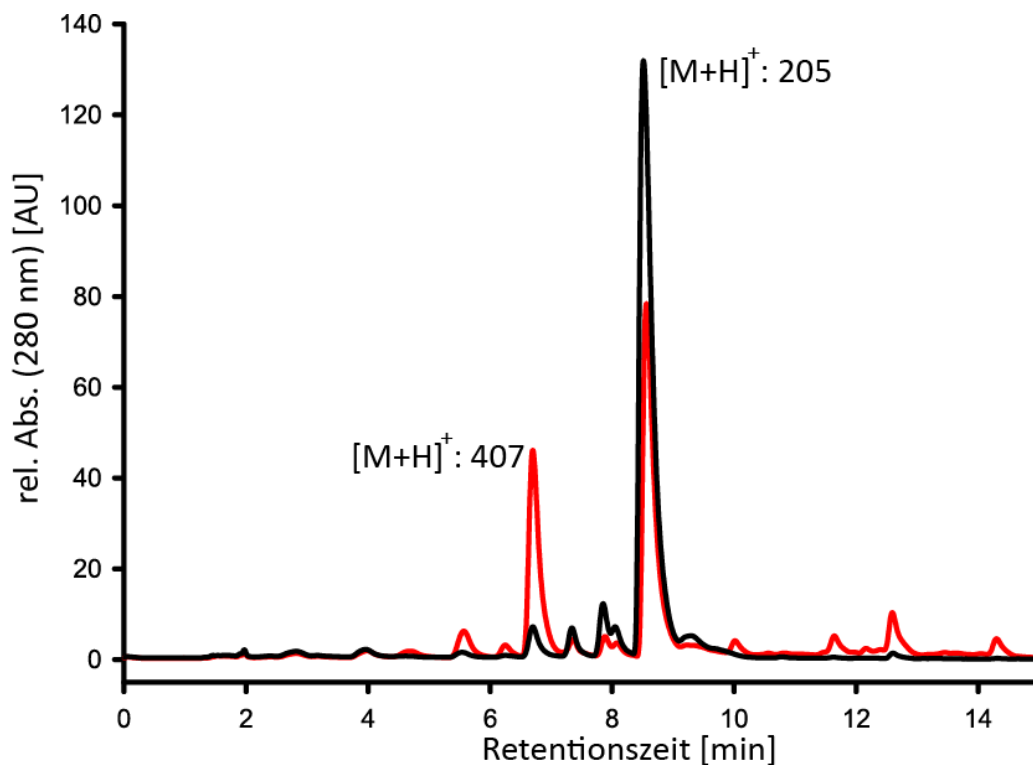


Abbildung 31: HPLC-Profil des Assayextraktes des Laccaseassays. Im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) kann in der Probe (rot) ein deutlicher Umsatz von Bufotenin (8,6 min, $[M+H]^+$: 205) zu einem neuen Produkt (RT 6,8 min $[M+H]^+$: 407) beobachtet werden. Die Masse des neuen Produktes entspricht der eines Bufotenindimers unter Verlust zweier Protonen. Der leichte Peak bei 6,7 in der Kontrolle stellt auch das Reaktionsprodukt dar, da als Kontrolle kein hitzeinaktiviertes Protein, sondern eine wenig aktive Fraktion verwendet wurde.

Peptidanalytik der Laccase

Nach tryptischem Verdau der gereinigten, nativen Proteinfraction mit Oxidationsaktivität und anschließender Peptidanalytik ergaben alle Proteindatenbanken Treffer für eine putative Laccase (siehe Methoden 4.1.2). Die codierende Sequenz für die Laccase (Lac), *lac*, wird von 13 Introns unterbrochen und hat eine Länge von 1587 Basenpaaren. Lac hat, bestehend aus 528 Aminosäuren, eine Masse von 57 Kilodalton. Lac zeigt nach Alignments über BLAST eine hohe Ähnlichkeit zu vier hypothetischen Proteinen aus *P. cyanescens* mit Prozentsätzen von 64 - 70 % identischer Aminosäuren. Auch zu hypothetischen Proteinen aus den psilocybinproduzierenden Pilzen *Psilocybe serbica*, *Gymnopilus dilepis* und *Panaeolus cyanescens* liegt eine hohe Ähnlichkeit mit 63 %, 63 % und 60 % identischer Aminosäuren vor (Reynolds 2018, Fricke 2017). Weiterhin zeigt die putative Laccase eine hohe Ähnlichkeit zu Laccasen aus anderen Basidiomyceten, so z.B. zu *Cyathus bulleri* und *Stropharia aeruginosa* mit 67 bzw. 64 % identischer Aminosäuren.

Alignments der Proteinsequenzen von Lac und den hypothetischen Proteinen mit hoher Übereinstimmung zu Lac aus *Psilocybe serbica* (*Pser*), *Psilocybe cyanescens* (*Pcya*), *Gymnopilus dilepis* (*Gdil*) und *Panaeolus cyanescens* (*PaCy*) wurden mittels des von Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) bereitgestellten Algorithmus erstellt. Das Alignment ist im Anhang einzusehen.

Tab. 6: Putative Laccase mit Angabe zum Fundort der codierenden Sequenz, der Datenbank, in welcher diese gefunden wurden, sowie zur Anzahl der Peptidfragmente, welche durch die Peptidanalytik Übereinstimmung mit theoretisch berechneten Fragmenten ergaben. Die Peptidanalytik erfolgte in Kooperation mit Dr. Daniel Braga de Lima am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Jena.

Name	Ort im Genom	Datenbanken	Peptidfragmente
Laccase	NODE_268_g221.t1	ANID, CCIN, LBIC, PCHR	2, 5, 9, 1

Laccasen aus Basidiomyceten wurden aufgrund ihrer Rolle im Ligninabbau eingehend erforscht. Bisher wurden mehr als 100 Laccasen aus Basidiomyceten (teil-) charakterisiert (Baldrian 2006). Über Alignments verschiedener fungaler Laccasen konnten mehrere konservierte Bereiche in den Aminosäuresequenzen gefunden werden, gerade für jene Bereiche, in denen die drei katalytisch aktiven Kupferzentren vorliegen. So finden sich auch in der hier gefundenen Laccase die Signaturen in der Aminosäuresequenz HWHG-X₉-DG-X₆-QCPI; GTXWYHSH-X₃-QYCXDGLXGX; HPXHLHGH und, mit leichten Abweichungen, G-(PA)-WX-(LFV)-

HCHIDAEXHX₃-G-(LMF)-X₃-(LFM) (Kumar *et al.* 2003). Für die letzte Signatur wurde später eine genauere Aminosäuresequenz, GPWXLHCHIDxH-X₃-GL-X₃-F, angegeben, welche mit der hier gefundenen Laccase übereinstimmt (Kilaru *et al.* 2006, siehe auch Aminosäuresequenz der hier gefundenen Laccase sowie Alignments mit putativen Laccasen im Anhang).

Die hier beschriebene putative Laccase zeigt zudem eine kurze Membranankersequenz. Zur Vorhersage der Membranankersequenz wurde der Algorithmus Phobius (Käll *et al.* 2004) verwendet.

Heterologe Produktion der putativen Psilocybinbiosyntheseenzyme

Die gefundene Tryptophandecarboxylase sowie die Psilocybin kinase wurden nicht weiter charakterisiert. Im Laufe dieser Arbeit konnte der für die Biosyntheseenzyme des Psilocybins codierende Gencluster gefunden und die einzelnen Biosyntheseenzyme charakterisiert werden. Es zeigte sich, dass die hier vorgestellten putativen Biosyntheseenzyme nicht mit diesen übereinstimmen (Fricke *et al.* 2017).

Heterologe Produktion der Phosphatasen

Die beiden Kandidatenenzyme für die Psilocybinphosphatase wurden erfolgreich als N-Terminale Hexahistidin-Fusionsproteine heterolog in *E. coli* KRX produziert (siehe Kapitel 4.1.2). In einem *in-vitro* Produktbildungsassay konnte für beide Enzyme der Umsatz von Psilocybin zu Psilocin beobachtet werden (Abb. 32).

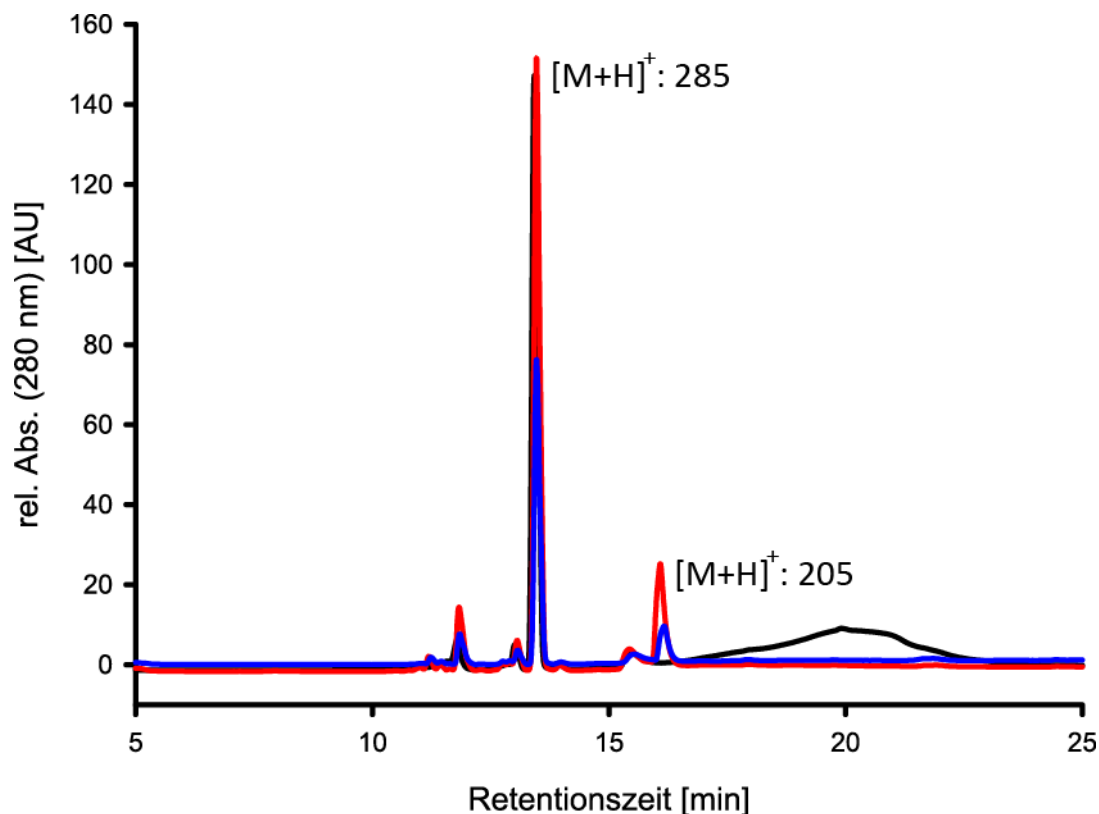


Abbildung 32: HPLC-Profil des Assayextraktes des Phosphataseassays. Im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) kann in den Proben (Phos1: rot; Phos2: blau) ein deutlicher Umsatz von Psilocybin (RT 13,5 min, $[M+H]^+$: 285) zu Psilocin (RT 16,1 min, $[M+H]^+$: 205) beobachtet werden. Der ohne Standardkurven schwer zu quantifizierende Umsatz lag allein durch Beurteilung durch die Peakflächen bei ca. 20 % für Phos1 und bei ca. 10 % für Phos2.

Heterologe Produktion Laccase

Nach Transformation von *Aspergillus niger* (siehe Kapitel 4.1.2) konnten keine positiven Transformanten erhalten werden. Die Transformation von *E. coli* verlief problemlos (siehe Kapitel 4.1.2). Jedoch konnte eine erfolgreiche Proteinproduktion nicht über einen *in-vitro*-Produktbildungsassay nachgewiesen werden.

MALDI-Analytik des chemischen Oxidationsproduktes des Psilocins

Die Analytik der chemischen Oxidationsprodukte des Psilocins (siehe Kapitel 4.1.2) ergab Hinweise auf eine Polymerstruktur des Reaktionsproduktes (Abb. 33, Abb. 34).

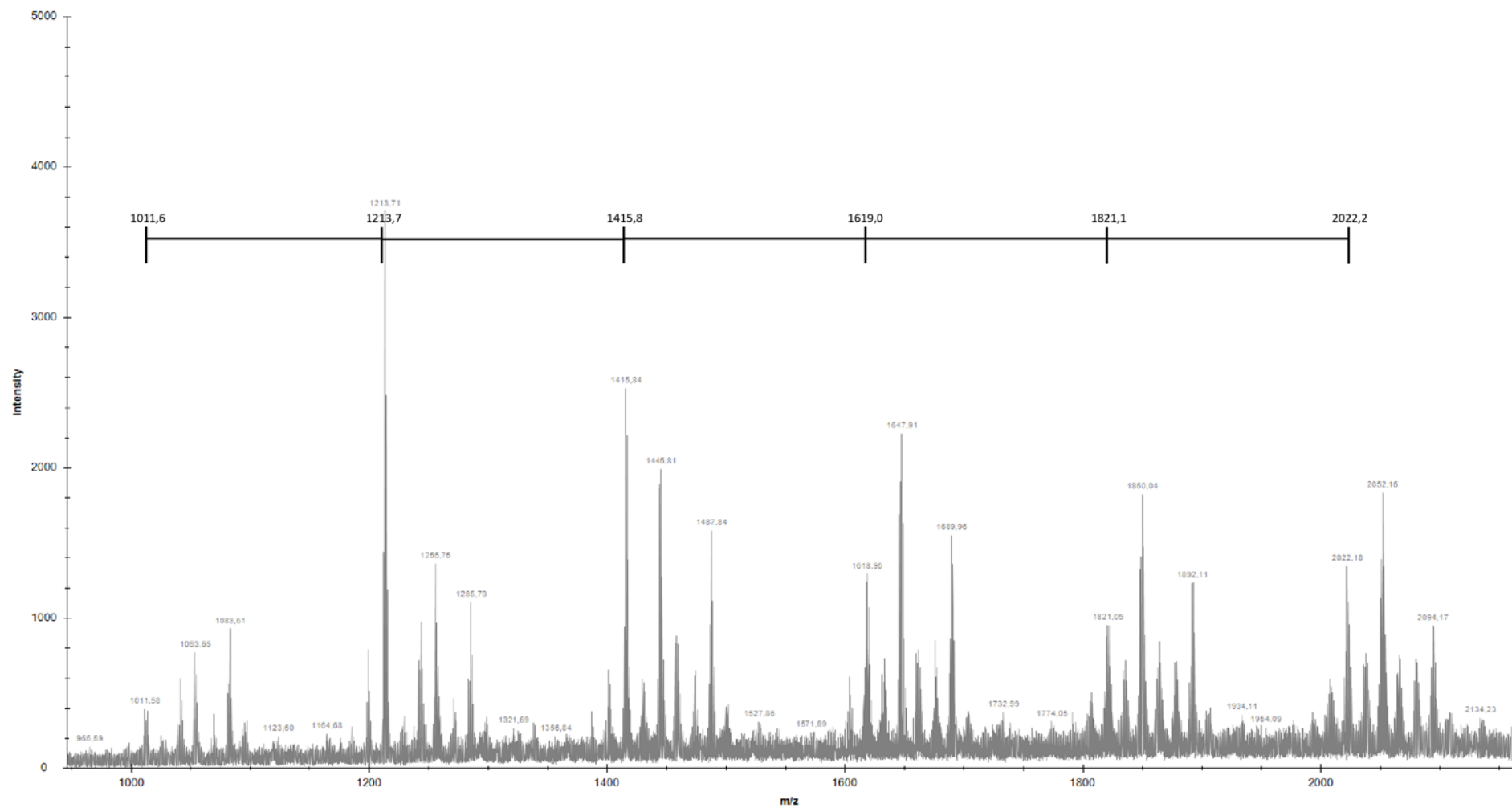


Abbildung 33: Ausschnitt des Massenprofils der MALDI-TOF-Messung des blauen Farbstoffes. Es können Peakmuster in einem Abstand von ca. 202 Masseneinheiten beobachtet werden. Die Messung erfolge in Kooperation mit Dr. María García-Altares Pérez am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Jena.

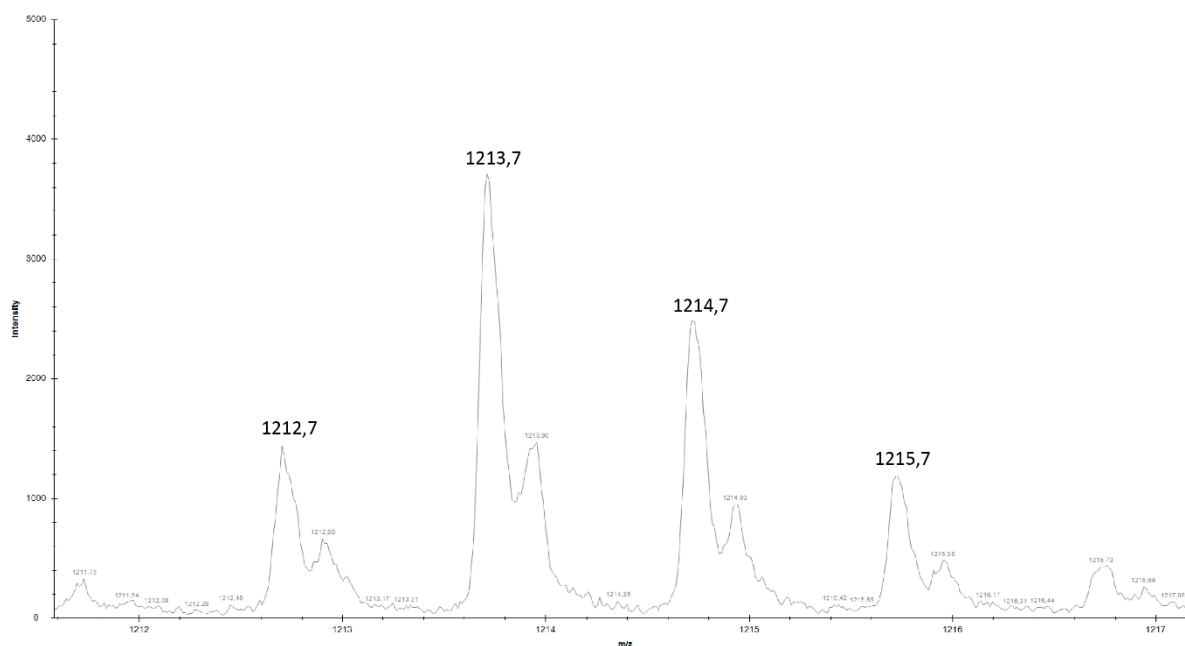


Abbildung 34: Ausschnitt des Massenprofils der MALDI-TOF-Messung des blauen Farbstoffes. Die Messung erfolgte in Kooperation mit Dr. María García-Altares Pérez am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Jena.

Aus Abb. 33 wird der regelmäßige Abstand der beobachteten Massen ersichtlich. Dieser beläuft sich immer auf ca. 202 Masseneinheiten, was einer hinzugefügten Psilocineinheit (bei Verlust zweier Protonen) entspricht. Weitere Peaks innerhalb einer Gruppe sind vermutlich auf schwerere Addukte (Bsp. $[M+ACN]^+$) zurückzuführen. Abb. 34 zeigt einen hochaufgelösten Massebereich. Die hier beobachteten Massenabstände lassen vermuten, dass neben den einfach verknüpften Psilocinpolymeren auch Polymere in verschiedenen Oxidationsstufen und somit einer unterschiedlichen Zahl von Protonen vorliegen. Es ergibt sich allgemein für die Masse eines nichtoxidierten Psilocinoligomers aus n Einheiten: $m_{\text{Red}}(n) = [(204,13 \cdot n) - (2 \cdot (n-1))]$. Eine mögliche Strukturformel für das Psilocinoligomer ist in Abb. 38 und Abb. 39 gezeigt.

4.1.2 Methoden

Die im Folgenden verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich und die verwendeten Lösungsmittel von Carl Roth bezogen.

Extraktion von Sekundärmetaboliten

Zur Analytik von Indolderivaten aus *Psilocybe serbica* P199 wurde eine Kultur dieses Pilzes auf Malzextrakt/Sojapepton (MEP)-Medium (1,8 % Agar) mit einem sterilen Skalpell in ca. 2 mm³-große Würfel geschnitten um zwei Kolben mit je 400 ml MEP-Medium anzuimpfen. Diese Kulturen wurden 20 d bei RT und 140 rpm geschüttelt. Das fertig gewachsene Mycel wurde über Miracloth (Merck Millipore) abfiltriert, mit ddH₂O gewaschen und zwischen Filterpapier und Papiertüchern leicht trockengepresst. Die Mycelmasse wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörsert und in einem Erlenmeyerkolben mit 200 ml Methanol für 18 h bei 140 rpm geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde mittels Filtration von der Mycelmasse getrennt, mit Natriumsulfat getrocknet, das Methanol unter vermindertem Druck und das restliche Wasser über Lyophilisation entfernt. Der Rückstand wurde in 1,5 ml Methanol aufgenommen, filtriert und mittels HPLC-HRMS analysiert.

Fruchtkörper von *P. cubensis* wurden wie in Publikation 2 (Lenz *et al.* 2017) beschrieben angezogen. Zur Extraktion von Psilocin und Psilocybin wurden die Fruchtkörper geerntet, manuell von Erde gesäubert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit Methanol (50 ml/10 g Biomasse) für 18 h bei 140 rpm und 21 °C extrahiert. Anschließend wurde durch Miracloth gefiltert, das Methanol unter vermindertem Druck und das restliche Wasser über Lyophilisation entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) aufgenommen (ca. 20 ml/200 g extrahierter Biomasse). Anschließend wurden 20 ml Cyclohexan zugegeben, gevortext und 5 min bei 13750 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig entfernt, durch Watte gefiltert und mittels HPCL/HRMS analysiert.

Reinigung und Analytik von Extrakten über chromatographische Methoden

Zur Reinigung von Psilocin und Psilocybin für Enzymassays wurde zunächst über eine Eclipse XDB-C8 Säule (21,2 x 250 mm, Partikelgröße 7 µm, Agilent) angeschlossen an eine 1260 Infinity HPLC (Agilent Technologies) fraktioniert. Es wurden je 5 ml eingespritzt. Als Laufmittel wurden ACN (A) und Wasser mit 0,1 % TFA (B) genutzt. Der Fluss lag bei 15 ml/min, zur Detektion wurde die Absorption bei 280 nm aufgezeichnet. Zur Elution wurde von 0 – 2 min isokratisch bei 10 % A, von 2 – 5 min ein Gradient auf 30 % A und von 5 – 9 min ein Gradient von 30 % auf 70 % A gefahren. Die einzelnen Fraktionen wurden über HPLC-MS auf ihren Psilocin/Psilocybingehalt hin untersucht. Die gewünschten Fraktionen wurden vereinigt, das Acetonitril unter vermindertem Druck und das Wasser über Lyophilisation entfernt. Der

Rückstand wurde in ca. 1 ml Wasser mit 0,1 % TFA aufgenommen. Dieser wurde über eine Eclipse XDB-C8 Säule (9,4 x 250 mm, Partikelgröße 5 µm, Agilent) angeschlossen an eine 1200 Series HPLC (Agilent Technologies), ausgestattet mit einem Dioden-Array-Detektor mit einem Wellenlängenbereich von 190-600 nm, weiter fraktioniert. Es wurden je 30 – 80 µl eingespritzt. Der Fluss lag bei 2,5 ml/min. Zur Elution wurde von 0 – 2 min ein Gradient von 5 % auf 15 % A, gefolgt von einem isokratischen Schritt bei 15 % A, verwendet. Die einzelnen Fraktionen wurden über HPLC-MS analysiert, anschließend wurde das Acetonitril unter vermindertem Druck und das Wasser über Gefriertrocknung entfernt. Der Rückstand wurde in dem Reaktionspuffer des jeweiligen Enzymassays aufgenommen.

Lyophilisierte Fruchtkörper von *Amanita citrina* enthalten zwischen 0,4 und 1,5 % Bufotenin (Stijve, 1979). Zur Gewinnung von Bufotenin wurden daher Fruchtkörper von *Amanita citrina* gesammelt und extrahiert. Die Fruchtkörper wurden in einem Mischwald in der Nähe von Trockenborn-Wolfersdorf (N 50,795; O 11,673) gesammelt, entsprechend dem Protokoll zur *P. cubensis* extrahiert und das Bufotenin mit den gleichen Methoden wie bei Psilocin gereinigt. Das reine Bufotenin wurde in 20 mM MOPS-Puffer (pH 7,5) aufgenommen.

Zur Analytik der Extrakte und Enzymassays welche Indolderivate wie Tryptophan, Psilocin, Psilocybin, Bufotenin und deren Reaktionsprodukte enthielten, wurde eine 1260 Infinity HPLC (Agilent), ausgestattet mit einem Dioden-Array-Detektor mit einem Wellenlängenbereich von 190-600 nm, gekoppelt an die MS 6130 Quadropole LC/MS (Agilent) ausgestattet mit einer ESI-Ionisationsquelle, verwendet. Gemessen wurde auf einer Eclipse XDB C-18 Säule (4,6 x 150 mm, Partikelgröße 5 µm, Agilent). Die Laufmittel waren Wasser mit 0,1 % TFA (A) und ACN (B). Es wurde ein Gradient von 5 % B auf 19 % B in 12 min bei einem Fluss von 1 ml/min verwendet.

Zur hochauflösenden Analytik mittels HPLC-HRMS der Extrakte, welche Indolderivate enthielten, wurde wie in Publikation 1 (Wick, 2016) beschrieben vorgegangen.

Zur Analytik des Phosphataseassays mit heterolog produziertem Protein wurde die oben genannte HPLC-MS, ausgestattet mit einer Hypercarb-Säule (150 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm, Thermo Scientific), verwendet. Auf einen isokratischen Schritt bei 5 % B für 5 min folgte ein Gradient auf 95 % B bei einem Fluss von 1 ml/min.

Extraktion von nativem Protein aus *P. cubensis* Fruchtkörpern

Natives, pilzliches Protein wurde mittels Ionenaustauschchromatographie (Anion Exchange Chromatography, IEX), hydrophober Interaktionschromatographie (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) und Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) gereinigt. Dabei wurden nach jedem Reinigungsschritt alle Fraktionen mittels eines *in-vitro*-Produktbildungsassays auf die jeweils gesuchte Enzymaktivität hin untersucht.

Zur Extraktion des nativen Proteins wurden 10 g Fruchtkörper von *P. cubensis* P 202 mechanisch von Erde gesäubert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, fein gemörsert und in einem 50 ml-Reaktionsgefäß mit dem jeweiligen Laufpuffer zur Reinigung mittels IEX auf 50 ml aufgefüllt. Nach kurzem Schütteln (1-3 min) wurde bei 13750 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand (ca. 45 ml) wurde über Watte gefiltert und konnte in die FPLC eingespritzt werden.

Fraktionierung von nativem Protein über IEX

Zur Proteinreinigung wurde eine Äkta Pure FPLC (GE Healthcare) ausgestattet mit einer Q-Sepharose Fast Flow Ionenaustauschsäule (Säulenvolumen, CV, 50 ml) verwendet. Die Proteinlösung wurde über einen 50 ml-Probengeber aufgetragen. Der Fluss lag bei 1 ml/min. Ab dem Waschschrift wurden die Fraktionen (je 2,2 ml) durchgängig gesammelt. Ab dem Elutionsschritt wurde das Fraktionsvolumen auf 2,0 ml verringert.

Tab. 7: Verwendete Puffer für die Fraktionierung nativen Proteins mittels IEX. Alle Puffer wurden mit ddH₂O auf 1 L aufgefüllt und der pH-Wert mit 1N NaOH oder 1N HCl auf 7,0 eingestellt.

Name	Zusammensetzung	Menge
PBS-Puffer A (50 mM NaCl)	NaH ₂ PO ₄	6,9 g
	NaCl	2,9 g
PBS-Puffer B (1,5 M NaCl)	NaH ₂ PO ₄	6,9 g
	NaCl	86,7 g
IEX-Tris-Puffer A (50 mM NaCl)	TRIS	3,03 g
	NaCl	2,9 g
IEX-Tris-Puffer B (1,5 M NaCl)	TRIS	3,03 g
	NaCl	86,7 g

Tab. 8: FPLC-Programm für die Fraktionierung nativen Proteins mittels IEX

Schritt	Laufmittel	Volumen 1 CV = 50 ml	Kommentar
Äquilibration	A	1 CV	
Injektion	A	0,9 CV	
Waschschritt	A	0,5 CV	
Elution	A; B	1,5 CV	Der Anteil von B am Laufmittel wurde linear von 0 – 100 % erhöht.
Säulenreinigung	Wasser	1 CV	Die Säulenreinigung wurde meist einen Tag nach der Proteinreinigung durchgeführt. Dafür wurde die Säule nach dem Elutionsschritt ausgebaut und im Kühlschank bei 4 °C aufbewahrt.
	NaOH (1M)	2 CV	
	Wasser	1 CV	
	NaCl (1,5 M)	1,5 CV	
	Wasser	2 CV	
	EtOH (20%)	2 CV	

Fraktionierung von vorgereinigtem Protein über hydrophobe Interaktionschromatographie

Nach Fraktionierung des nativen Proteins mittels IEX wurde die Fraktion, welche im jeweiligen *in-vitro* Assay Umsatz zeigte, weiterer Fraktionierung mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) unterzogen. Dazu wurde die aktive Proteinfraction (6 – 16 ml) mittels PD-10 Säule auf HIC-Puffer A umgepuffert und in die FPLC gegeben. Als Säule wurde eine Hitrap Phenyl HP mit einem Volumen von 1 ml verwendet. Der Fluss lag bei 1 ml/min. Während des Elutionsschrittes wurden die Fraktionen (je 0,5 ml) gesammelt.

Tab. 9: Verwendete Puffer für die Fraktionierung nativen Proteins mittels HIC

Name		Zusammensetzung	Menge	Kommentar
HIC-Puffer (Hochsalz)	A	NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄	6,95 g 208,5 g	Mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen, pH mit 1N HCl auf 7,0 einstellen
HIC-Puffer (Niedrigsalz)	B	NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄	6,95 g 6,6 g	Mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen, pH mit 1N HCl auf 7,0 einstellen
HIC-Puffer (Hochsalz)	C	MOPS (NH ₄) ₂ SO ₄	4,2 g 208,5 g	Mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen, pH mit 1N NaOH auf 7,5 einstellen
HIC-Puffer (Niedrigsalz)	D	MOPS (NH ₄) ₂ SO ₄	4,2 g 6,6 g	Mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen, pH mit 1N NaOH auf 7,5 einstellen

Tab. 10: FPLC-Programm für die Fraktionierung nativen Proteins mittels HIC

Schritt	Laufmittel	Volumen 1 CV = 1 ml	Kommentar
Equilibrierung	A	5 CV	
Injektion	A	13 CV	
Waschschritt	A; B	5 CV	5 % B im Laufmittel
Elution	A; B	30 CV Grad. 10 CV Isok.	Der Anteil von B am Laufmittel wurde linear von 5 – 100 % erhöht. Anschließend folgte ein isokratischer Schritt bei 100 % B.
Säulenreinigung	Wasser	5 CV	Die Säulenreinigung wurde meist einen Tag nach der Proteinreinigung durchgeführt. Dafür wurde die Säule nach dem Elutionsschritt ausgebaut und im Kühlschank bei 4 °C aufbewahrt.
	NaOH (1M)	5 CV	
	Wasser	5 CV	
	EtOH (20%)	5 CV	

Fraktionierung von vorgereinigtem Protein über Größenausschlusschromatographie

Nach Fraktionierung des nativen Proteins mittels HIC wurde die Fraktion, welche im jeweiligen *in-vitro* Assay Umsatz zeigte, weiterer Fraktionierung mittels Größenausschlusschromatographie unterzogen. Dazu wurde die aktive Proteinfraction mittels

PD-10 Säule auf den jeweiligen SEC-Puffer umgepuffert. Anders als bei den vorherigen FPLC-Reinigungsschritten braucht man für den SEC-Reinigungsschritt nur einen einzigen Puffer. Als Puffer wählt man den Reaktionspuffer des jeweiligen *in-vitro* Produktbildungsassays. Als Säule wurde eine Superdex 200 Increase 10/300 GL mit einem Säulenvolumen von 24 ml verwendet. Als Probengeber wurde eine Probenschleife mit einem Volumen von 884 µl verwendet. Daher wurde die aktive umgepufferte Fraktion nach der Reinigung mittels HIC mit einem Amicon-Filter (Merck Millipore, 10 kDa Cutoff) mittels Zentrifugation bei 5000 g auf ein Volumen von ca. 800 µl aufkonzentriert. Eluiert wurde bei einem Fluss von 0,5 ml/min. Während des Elutionsschrittes wurden die Fraktionen (je 1 ml) gesammelt.

Tab. 11: Verwendete Puffer für die Fraktionierung nativen Proteins mittels SEC

Name	Zusammensetzung	Menge	Kommentar
SEC-Puffer Decarboxylase	TRIS MgCl ₂	1,22 g 0,2 g	mit ddH ₂ O auf 0,2 L auffüllen, pH mit HCl auf 7,4 einstellen.
SEC-Puffer Kinaseassay	NaH ₂ PO ₄	3,45 g	Mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen; pH mit 4 N NaOH auf 7,4 einstellen
SEC-Puffer C für tryptischen Verdau	NH ₄ HCO ₃	0,79 g	mit 200 ml H ₂ O auffüllen; pH bei 8,1
SEC-Puffer Phosphatase-, Laccaseassay	MOPS	4,2 g	Mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen, pH mit 1N NaOH auf 7,5 einstellen

Tab. 12: FPLC-Programm für die Fraktionierung nativen Proteins mittels SEC

Schritt	Laufmittel	Volumen 1 CV = 24 ml	Kommentar
Equilibrierung	A	1 CV	
Injektion	A	0,03 CV	
Elution	A	2 CV Isok.	Die Elution verläuft isokratisch bei 100 % A.
Säulenreinigung	Wasser	1 CV	Die Säulenreinigung erfolgte meist unmittelbar nach der Proteinreinigung.
	NaOH (1M)	2 CV	
	Wasser	1 CV	
	EtOH (20%)	1,5 CV	

Die Enzymfraktionen der vermuteten Kinase wurden in allen FPLC-Schritten jeweils über die Phosphatpuffer gereinigt. Die Enzymfraktionen für die vermutete Decarboxylase wurden für den IEX und HIC-Lauf über Phosphatpuffer, der SEC-Lauf über Tris-Puffer fraktioniert. Die vermutete Laccase und Phosphatase wurden im IEX-Lauf über den TRIS-Puffer, im HIC und SEC-Lauf über MOPS-Puffer aufgetrennt. Waren die aktiven Fraktionen bekannt, wurde im SEC-Lauf der Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (SEC-Puffer C) verwendet. Die Wahl der Puffersysteme in den jeweiligen Laufmitteln wirkte sich kaum auf das Elutionsverhalten der Proteine aus (siehe Tab. 7, 9 und 11).

***In vitro* Assay Decarboxylase**

Für den Tryptophan Decarboxylaseassay wurden 4 µl Tryptophan (50 mM in TRIS-Puffer, Tris 50 mM pH 7,4; Endkonzentration 3,1 mM), 20 µl PLP (4 mM in TRIS-Puffer; Endkonzentration 1,3 mM) und 40 µl Proteinlösung vorliegend in TRIS-Puffer, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt und 18 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Assay eingefroren und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 150 µl Wasser (+ 0,1 % TFA)/ACN (10:1) aufgenommen und mittels HPLC-MS vermessen (siehe: „Reinigung und Analytik von Extrakten über chromatographische Methoden“).

Als Kontrolle diente ein Ansatz mit bei 95 °C für 15 min denaturiertem Protein.

***In vitro* Assay Kinase**

Die vereinigten Fraktionen wurden aufkonzentriert und auf TRIS (50 mM pH 7,4) umgepuffert. Für den Kinaseassay wurden 100 µl ATP/MgCl₂-Lösung (gelöst in TRIS, 50 mM pH 7,4; Endkonzentration ATP/MgCl₂: 10 mM), 85 µl Proteinlösung und 13 µl Psilocin (64 mM, in TRIS, 50 mM pH 7,4; Endkonzentration 4 mM) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt und 18 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gefroren, 2-3 h lyophilisiert, in 100 µl Wasser:ACN (9:1) aufgenommen und mittels HPLC-MS analysiert (siehe: „Reinigung und Analytik von Extrakten über chromatographische Methoden“).

***In vitro* Assay Phosphatase**

Für den *in-vitro*-Phosphataseassay mit nativem Protein wurden 100 µl der jeweiligen Proteinfraction auf MOPS (20 mM, pH 7,5) oder Carbonatpuffer (NH₄HCO₃, 50 mM, pH 8,1) umgepuffert und mit 1 µl Psilocybin (90 mM in Wasser; Endkonzentration 0,9 mM) und 1 µl MgCl₂ (100 mM in Wasser, Endkonzentration 1 mM) in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für 30 s inkubiert. Der Assay wurde durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt, lyophilisiert und per HPLC-MS analysiert (siehe: „Reinigung und Analytik von Extrakten über chromatographische Methoden“).

***In vitro* Assay Laccase**

Für den Laccase-Assay wurden 99 µl der in 20 mM MOPS-Puffer (pH 7,5) umgepufferten Proteinfractionen mit je 1 µl Bufotenin (100 mM; Endkonzentration 1 mM) oder 1 µl Psilocin (93 mM; Endkonzentration 0,9 mM) für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gefroren, 2-3 h lyophilisiert, in 100 µl Wasser:ACN (9:1) aufgenommen und mittels HPLC-MS analysiert (siehe: „Reinigung und Analytik von Extrakten über chromatographische Methoden“).

Proteinverdau und Analytik mittels HRMS

Proteinfractionen, welche im jeweiligen *in-vitro*-Produktbildungsassay nach der Fraktionierung mittels SEC positiv getestet wurden, wurden mit Trypsin verdaut und anschließend mittels HRMS/MS-MS weiter analysiert.

Nach Fraktionierung mittels SEC befand sich das Protein in dem Puffer des jeweiligen

in-vitro-Produktbildungsassays. Falls nicht der Ammoniumhydrogencarbonatpuffer verwendet wurde, wurde vor dem tryptischen Verdau über PD-10 Säule auf diesen umgepuffert. Zunächst wurde die Proteinkonzentration der Probe mittels ihrer zugehörigen Peakfläche im FPLC-Profil grob bestimmt. Dabei wurde von der Näherung ausgegangen, dass 80 mAU*ml im FPLC-Profil etwa einer Proteinkonzentration von 300 µg/ml entsprechen. Zu 100 µl Proteinlösung wurde 50 µg Trypsin (0,2 µg/ µl, gelöst in HCl, 1 M) pro mg Protein gegeben. Anschließend wurde 18 h bei 37 °C inkubiert.

Peptidreinigung

Zur Reinigung, Entsalzung und Aufkonzentrierung der Peptidfragmente wurden eine Mikro-C18-Säule in einer Pipettenspitze („Ziptip“; Millipore) verwendet.

Tab. 13: Lösungen für das Ziptip-Protokoll

Lösung	Zusammensetzung
A	Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure (FA)
B	Wasser + 0,1 % FA
C	Probe
D	95 % Wasser + 0,1 % FA; 5 % ACN
E	50 % Wasser + 0,1 % FA; 50 % ACN

Zunächst wurde eine Ziptip-Säule fest auf eine 20 µl -Pipette gesteckt. Diese wurde auf 10 µl eingestellt. Zur Befeuchtung des Säulenmaterials wurden langsam 10 µl Lösung A in die Ziptip-Säule aufgenommen und wieder abgegeben. Dieser Schritt wurde ca. 10 x wiederholt, bis keine Luftblasen mehr aus der Ziptip-Säule entwichen. Mit heruntergedrücktem Pipettenkolben wurde die Ziptip-Säule in Lösung B transferiert. Zur Equilibrierung des Säulenmaterials wurde auch hier wieder 10 x 10 µl Lösung aufgenommen und abgegeben. Dabei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen in die Ziptip-Säule gelangen. Mit heruntergedrücktem Pipettenkolben wurde die Ziptip-Säule in Lösung C transferiert. Während auch hier wieder 10 x 10 µl Lösung langsam aufgenommen und abgegeben wurde, banden die Peptidfragmente an die Säule. Die Ziptip-Säule wurde nun zum Waschen und Entsalzen der Peptide wie oben in Lösung D transferiert und 10 x gewaschen. Zur Elution der

Peptidfragmente wurden zunächst 10 µl der Lösung E in die Ziptip-Säule aufgenommen. Nach ca. 20 Sek. Wartezeit wurde die Lösung in den HPLC-HRMS-Probenbehälter abgegeben. Dieser Schritt wurde zur kompletten Elution der Peptidfragmente einmal wiederholt.

Erstellen der Proteindatenbanken

Das vorliegende Genom von *P. cubensis* P 202 (Fricke *et al.* 2017) wurde mittels des Genvorhersageprogramms AUGUSTUS (Stanke *et al.* 2004) und dessen Annotationsalgorithmus in eine Proteindatenbank umgewandelt. Insgesamt wurden vier Datenbanken erstellt. Diese Datenbanken nutzten verschiedene Vorhersagealgorithmen basierend auf den Genmodellen der Pilze *Aspergillus nidulans*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Laccaria bicolor* und *Coprinus cinereus*.

Jede Datenbank lag als FASTA-File vor und konnte von dem Peptidanalytikprogramm MaxQuant (Tyanova *et al.* 2015) genutzt werden. Die Datenbanken wurden entsprechend dem Organismus, mit dem die Annotation durchgeführt wurde, in ANID, PCHR, LBIC und CCIN benannt. Mithilfe dieser Datenbanken konnte der Algorithmus von MaxQuant *in silico* generierte Peptidfragmente mit tatsächlichen, über UHPLC-MS/MS-MS generierten Peptidfragmenten vergleichen und so gemessene Peptidfragmente putativen Enzymen zuordnen.

Peptidanalytik mittels UHPLC-MS/MS-MS

Die Peptidanalytik erfolgte in Kooperation mit Dr. Daniel Braga de Lima, Mitarbeiter der Forschungsgruppe Synthetische Mikrobiologie des Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Jena.

Zur Peptidanalytik wurde ein UltiMate 3000 UHPLC mit einer HESI-Quelle gekoppelt an eine Q-Exactive Plus Orbitrap LC-MS/MS (Thermo Scientific) verwendet. Als Säule wurde eine Aeris PEPTIDE XDB-C18 (Phenomenex) mit einer Partikelgröße von 1,7 µm und einer Abmessung von 150 x 2,1 mm verwendet. Es wurden 10 µl Probe eingespritzt. Der Fluss lag bei 0,2 ml/min. Als Laufmittel wurden H₂O + 0,1 % Ameisensäure (FA, Laufmittel A) und ACN + 0,1 % FA (Laufmittel B) verwendet. Zunächst wurde bei 1 % B 2 min gespült. Anschließend wurde zwischen t = 2 und t = 9 min der Anteil von B linear auf 9 % erhöht. Zwischen t = 9 und t = 38

wurde nun der Anteil von B linear auf 55 % erhöht.

Über die Analytik der MS und MS/MS-Ergebnisse mittels der Software MaxQuant und dem Vergleich der Ergebnisse mit den selbstgenerierten Proteindatenbanken der genannten Pilze konnten putative Biosyntheseenzyme identifiziert werden.

Bioinformatische Untersuchung putativer Biosyntheseenzyme

Die über MS und MS/MS identifizierten Peptidsequenzen konnten über die Software MaxQuant putativen Biosyntheseenzymen zugeordnet werden. Gefundene Enzyme wurden mit der Protein-BLAST Bibliothek verglichen (Altschul *et al.* 1990, Boratyn *et al.* 2012). Aussichtsreiche Biosyntheseenzymkandidaten, welche große Ähnlichkeit mit bereits bekannten oder vermuteten passenden Biosyntheseenzymen aufwiesen, wurden genauer untersucht. Über Alignements wurden Introns innerhalb der codierenden Sequenzen identifiziert und die vermutete vollständige cDNA-Sequenz zusammengestellt. Mithilfe dieser konnten nun Primer für die Amplifikation der Gene von cDNAs erstellt werden.

RNA Extraktion und cDNA Synthese

RNA wurde aus ausgewachsenen Fruchtkörpern des *P. cubensis* P202 isoliert. Die Fruchtkörper wurden mechanisch gesäubert und die Stiele unter sterilen Bedingungen längs geteilt. Aus den inneren Stielbereichen wurden mit einem Skalpell ca. 3 mm³ große Würfel geschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert. Die RNA wurde über das SV Total RNA Isolation Systems (Promega) extrahiert. Die isolierte RNA wurde entweder bei – 80°C gelagert oder gleich zur cDNA-Synthese verwendet. cDNA wurde über das RevertAid RT-Kit (ThermoScientific) synthetisiert. Hierfür wurden Oligo (dT) und Anchored Oligo (dT)-Primer verwendet. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Zur Erstellung der Lac_NA Konstrukte wurden Primer verwendet, welche *lac* erst ab dem 51. Basenpaar amplifizieren und zusätzlich das Startcodon ATG einbauen. Der nichtamplifizierte, vordere Bereich codiert vermutlich für einen Membrananker- mit dessen Entfernen sollte die Löslichkeit des Proteins verbessert werden (siehe auch 4.1.1).

Primer

Tab. 14: Verwendete Primer

Bezeichnung	Verwendung	Basenfolge	Schnittstelle	T _m [°C]
oJW01	Lac F	TATATAGCTAGCATGAATTTCTTCTAAGCATC	<i>NheI</i>	64
oJW02	Lac R	TATATACTCGAGTTAATGGAACCTTTGAGGAG	<i>XhoI</i>	65
oJW03	Phy1 F	GCTAGCATGCACAGTCTCGGTC	<i>NheI</i>	64
oJW04	Phy1 R	CTCGAGCTACTTCTTCTTAGGCTTC	<i>XhoI</i>	63
oJW05	Phy2 F	GAATTCATGACCAACAGACCCGACATTG	<i>EcoRI</i>	65
oJW06	Phy2 R	CTCGAGTTAAGCTCGCTTCGGCG	<i>XhoI</i>	66
oJW08	Lac_Nco_F	CCATGGATGAATTTCTTCTAAGC	<i>NcoI</i>	58
oJW09	Lac_Nco_R	CCATGGTTAATGGAACCTTTGAG	<i>NcoI</i>	57
oJW10	Lac_NA_Nco_F	CCATGGATGGTCATGATAGGTC	<i>NcoI</i>	60
oJW11	Lac_NA_Nco_R	CCATGGTTAATGGAACCTTTGAGGAG	<i>NcoI</i>	62
oJW19	LacNA_pET_F	CATATGATGGTCATGATAGGTC	<i>NdeI</i>	58
oJW20	LacNA_pET_R	CTCGAGTTAATGGAACCTTTGAG	<i>XhoI</i>	59

Polymerase Kettenreaktion

Zur Amplifizierung codierender Sequenzen putativer Biosyntheseenzyme wurde eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt.

Tab. 15: PCR Ansatz und Bedingungen. Als Annealingtemperatur (T_m) wurde die durchschnittliche vom Hersteller angegebene T_m-2 °C der verwendeten Primer verwendet (siehe Tab. 14).

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Puffer (5x)	4 µl	98 °C	30 s
dNTP'-s (10 mM)	0,4 µl	98 °C	10 s
MgCl ₂ (50 mM)	2 µl	x °C	20 s
Primer (forw/rev) 10 pmol/ µl	je 2 µl	72 °C	1 min 45 s
DNA-Polymerase (Phusion, NEB)	0,2 µl	72 °C	5 min
cDNA	1 µl	4 °C	Lagerung
ddH ₂ O	8,4 µl		

Reinigung und Klonierung der PCR-Fragmente

PCR-Fragmente wurden auf 0,7 % (m/v) Agarosegelen mittels Gelelektrophorese getrennt.

Zur Ligation in pJET1.2 wurden die erhaltenen PCR-Fragmente zunächst aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und nach Herstellerangaben mit dem Gel-Recovery-Kit (ZYMO) aus dem Gel extrahiert. Das Insert wurde nach Herstellerangaben des Clone JET-Kit (Thermo Scientific) in den Vektor pJET1.2 ligiert. Der komplette Ligationsansatz wurde anschließend zur Transformation chemisch Kompetenter *E. coli* XL1 blue verwendet. Dafür wurden ca. 200 µl chemisch Kompetenter, bei – 80°C als Glycerolstock gelagerter *E. coli* XL1 blue auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde der Ligationsansatz zu der Zellsuspension gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Ligationsansatz wurde nun für 1 min auf 42 °C erwärmt und wieder kurz gekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ligationsansatz 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 5200 g für 30 s pelletiert, in 200 µl resuspendiert und 100 µl auf LB-Carbenicillin (50 µg Carbenicillin/ml Medium) Platten ausplattiert. Die Platte wurde für 18 h bei 37 °C inkubiert.

Einzelne Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher in ein Reagenzglas mit 4 ml LB-Medium mit Carbenicillin (50 µg Carbenicillin/ml Medium) überführt und für 18 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

Plasimidpräparation

Für die Plasmidpräparation wurde das Plasmid Miniprep Classic Kit der Firma Zymo Research verwendet. Die Konzentration und Reinheit der Plasmide wurde mittels eines ScanDrop-Gerätes (Analytik Jena) überprüft.

Über einen Kontrollverdau wurde überprüft, ob der gewünschte Vektor vorlag. Hierzu wurden 2 µl Plasmidlösung, 16 µl Wasser, 2 µl Puffer und 1 µl (20 Units) eines geeigneten Restriktionsenzym in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde anschließend per Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Zur Überprüfung der Lage und Vollständigkeit des Inserts wurden pJET 1.2 Plasmide mit dem jeweiligen Insert nach Firmenvorgaben von GATC Biotech sequenziert.

Erstellung von Expressionskonstrukten

Zur Erstellung der pET-Expressionskonstrukte wurden pJET-Vektoren mit dem jeweiligen Insert sowie zirkuläres pET 28a Plasmid präparativ verdaut. Dafür wurden 10 µl Plasmidlösung (100 ng/ µl) mit 5 µl des passenden Restriktionspuffers (10x) und je 2 µl der passenden Restriktionsenzyme (Tab. 16) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Das Volumen der Plasmidmenge wurde je nach Konzentration angepasst (für eine Endkonzentration von 20 ng/µl). Anschließend wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Parallel wurde ein Ansatz mit pJET 1.2 mit Insert sowie ein Ansatz pET 28a für 1 h bei 37 °C verdaut.

Der fertige Verdau wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt. Die Bande mit dem Insert sowie die Bande für den linearisierten pET 28a-Vektor wurden ausgeschnitten und aus dem Gel gereinigt.

Zur Ligation des Inserts in den linearen pET 28a-Vektor wurden 5 µl pET 28a, 10 µl Insert, 2 µl Ligasepuffer (10x) und 2 µl T4-Ligase in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Die Ligation wurde 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Der komplette Ligationsansatz wurde zur Plasmidvervielfältigung verwendet, um *E. coli* XL1 blue damit zu transformieren.

Zur Erstellung der SM Tag X2-Vektoren zur Transformation von *Aspergillus niger* wurden die jeweiligen Gensequenzen über die *Nco*I-Schnittstellen ausgeschnitten und in den geschnittenen SM-Tag X2-Vektor ligiert (siehe oben). Die fertigen Vektoren wurden in *E. coli* XL1 blue vervielfältigt.

Tab. 16: Liste der erstellten Plasmide, Plasmidkarten siehe Anhang

Name	Größe des Inserts [bp]	Vektor	Beschreibung
pJW03	1593	pJET 1.2	<i>lac</i> in pJET 1.2 blunt ligiert
pJW04	1665	pJET 1.2	<i>phy1</i> in pJET 1.2 blunt ligiert
pJW05	1968	pJET 1.2	<i>phy2</i> in pJET 1.2 blunt ligiert
pJW06	1593	pET 28a	<i>phy1</i> in pET 28a über <i>NheI/XhoI</i>
pJW07	1665	pET 28a	<i>phy2</i> in pET 28a über <i>EcoRI/XhoI</i>
pJW08	1968	pET 28a	<i>lac</i> in pET 28a über <i>NheI/XhoI</i>
pJW09	1599	pJet 1.2	<i>lac</i> in pJet 1.2 ligiert
pJW10	1548	pJet 1.2	<i>lacNA</i> in pJet 1.2 ligiert
pJW11	1599	SM Tag X2	<i>lac</i> in SM Tag X2 ligiert
pJW12	1548	SM Tag X2	<i>lacNA</i> in SM Tag X2 ligiert
pJW15	1548	pJet 1.2	<i>lacNA2</i> in pJet 1.2 ligiert
pJW17	1548	pET28a	<i>lacNA2</i> in pET28a ligiert

Transformation und heterologe Proteinproduktion in *E. coli*

Tab. 17: Kulturmedien für *E. coli*

Name	Zusammensetzung	Menge	Anmerkungen
LB-Medium	Trypton	10 g	mit Wasser auf 1 L auffüllen
	Hefeextrakt	10 g	
	Natriumchlorid	5 g	
AI-Medium	Trypton	10 g	mit Wasser auf 1 L auffüllen. Die Zuckerlösung nach Autoklavieren zugeben
	Hefeextrakt	10 g	
	Puffer M	20 ml	
	MgSO ₄	0,5 g	
	Zuckerlösung	20 ml	
Puffer M	Na ₂ HPO ₄	127,5 g	Mit Wasser auf 1 L auffüllen
	KH ₂ PO ₄	170,1 g	
	NH ₄ Cl	133,8 g	
	Na ₂ SO ₄	35,5 g	
Zuckerlösung (50x)	Glycerol 86 %	29,1 g	Mit Wasser auf 1 L auffüllen, sterilfiltrieren
	Glucose	2,5 g	
	Lactose	10 g	

Tab. 18: Puffer und Lösungen zur Proteinproduktion

Name	Stoff	Menge	Anmerkung
Lyse-/Waschpuffer	Imidazol	0,68 g	Mit Wasser auf 1 L auffüllen, pH-Wert mit NaOH/HCl auf 8,0 einstellen
	NaH ₂ PO ₄	6,9 g	
Elutionspuffer	Imidazol	27,2 g	Mit Wasser auf 1 L auffüllen, pH-Wert mit NaOH/HCl auf 8,0 einstellen
	NaH ₂ PO ₄	6,9 g	

Zur Produktion der folgenden Proteine wurden *E. coli* KRX oder BL21(DE3) Zellen mit den jeweiligen Plasmiden transformiert. Es wurde je eine monoklonale Vorkultur angelegt, indem 50 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin mit einer Kolonie angeimpft und 16 h bei 140 rpm

und 37 °C geschüttelt wurde. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurde anschließend LB-Medium (KRX) oder AI-Medium (BL 21) angeimpft. Diese wurde bei 37 °C bei 180 rpm für ca. 4 h bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀: 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen auf 16 °C bei 180 rpm gekühlt und mit je 1 ml steriler L-Rhamnoselösung (20 % w/v, 200x, Endkonzentration 0,1 %) induziert (KRX). BL 21 Kulturen wurden in AI-Medium kühl weiterinkubiert. Es wurde weitere 18 h bei 16 °C und 180 rpm inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 3220 g für 20 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 12 ml Lysepuffer resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Der Zellaufschluss erfolgte über ein Ultraschallgerät (BANDELIN Sonoplus) mit einem Pulsprogramm von 5 s Puls (135 J) gefolgt von 15 s Pause; je 5x. Die Zellreste wurden bei 13500 g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand mit 2,5 ml Ni-NTA Suspension für 1h bei 100 rpm bei 0 °C inkubiert. Die Proteinlösung mit Ni-NTA wurde anschließend auf eine Gravity-Flow-Säule geladen. Der Durchfluss wurde verworfen. Nach Waschen mit 8 ml Waschpuffer wurde mit 2,5 ml Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde auf eine PD-10-Säule (Sephadex G 25M; GE Healthcare) geladen. Eluiert wurde mit 3,5 ml des jeweiligen Puffers für den Produktbildungsassay (siehe Tab. 19). Das Eluat wurde auf einen Amicon-Filter (10 kDa Größenausschluß; MERCK) geladen und durch Zentrifugation bei 4000 g auf 400 µl eingengt.

Das aufkonzentrierte Protein konnte nun in *in-vitro* Produktbildungsassays eingesetzt werden.

In *E. coli* heterolog produzierte Phosphatase

Zur heterologen Proteinproduktion der zwei Phosphatasen wurden *E. coli* KRX-Zellen je mit pJW06 und pJW07 transformiert, in LB-Medium angezogen und mit L-Rhamnose induziert.

In *E. coli* heterolog produzierte Laccase

Zur heterologen Proteinproduktion der Laccasen wurden *E. coli* KRX-Zellen mit pJW08 und pJW17 transformiert, in LB-Medium angezogen und mit L-Rhamnose induziert.

Transformation von *Aspergillus niger*

Zur Transformation von *Aspergillus niger* wurde analog zu bereits veröffentlichten Protokollen vorgegangen (Gressler *et al.* 2015, Fricke *et al.* 2017).

***In-vitro* Assay**

Die *in-vitro* Produktbildungsassays wurden zunächst ausgehend von den bereits durchgeführten Produktbildungsassays mit FPLC-gereinigtem nativem Protein durchgeführt. Es zeigte sich aber, dass pH- und Puffersysteme für die Assays mit heterolog produziertem Protein angepasst werden mussten.

Tab. 19: Reaktionspuffer für *in-vitro* Produktbildungsassays

Name	Stoff	Menge	Anmerkung
Reaktionspuffer	Natriumacetat	0,82 g	Mit Wasser auf 200 ml auffüllen,
Phosphatase/Laccase	EDTA	0,74 g	pH-Wert mit Eisessig auf 5,0 einstellen
Reaktionspuffer	MOPS	4,2 g	Mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen, pH mit
Laccase 2			1N NaOH auf 7,5 einstellen

***In-vitro* Assay für heterolog produzierter Phosphatase**

Für den *in-vitro*-Phosphataseassay mit heterolog produziertem Protein wurden 99 µl der im Acetat-Puffer (Natriumacetat 50 mM, EDTA 10 mM, pH 5,0) vorliegenden und aufkonzentrierten Phosphatase mit 1 µl Psilocybin (100 mM in H₂O, Endkonzentration 1 mM) inkubiert. Der Assay wurde nach 2 h durch Einfrieren bei -80 °C gestoppt und anschließend lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 150 µl Methanol aufgenommen, gefiltert und per HPLC-MS analysiert.

***In-vitro* Assay für heterolog produzierte Laccase**

Für den Produktbildungsassay wurden 99 µl der im Acetat-Puffer (Natriumacetat 50 mM, EDTA 10 mM, pH 5,0) oder MOPS-Puffer (20 mM MOPS, pH 7,5) vorliegenden und aufkonzentrierten Laccase mit entweder 1 µl Psilocin (100 mM in Wasser, Endkonzentration 1 mM) oder 0,3 µl Bufotenin (312 mM in Wasser, Endkonzentration 1 mM) für 4 h inkubiert. Der Assay wurde anschließend durch Einfrieren bei -80 °C gestoppt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 150 µl Methanol aufgenommen, gefiltert und per HPLC-MS analysiert.

Analytik des chemischen Oxidationsproduktes des Psilocins

Die Analytik des blauen Farbstoffes erfolgte in Kooperation mit Dr. María García-Altares Pérez, Mitarbeiterin der Forschungsgruppe Biomolekulare Chemie des Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Jena.

Die Analytik des blauen Oxidationsproduktes des Psilocins wurde dadurch erschwert, dass es in allen getesteten Lösungsmitteln unlöslich war und zusätzlich stark an Proteine zu binden schien. Enzymatisch oxidiertes Psilocin konnte daher nicht weiter analysiert werden. Daher wurde auf chemische Oxidation und Analytik über MALDI-MS zurückgegriffen.

Dafür wurden 100 µl Psilocin (93 mM in Wasser) mit 200 µl FeCl₃ (100 mM in Wasser) in 800 µl Wasser vereinigt. Das tiefblau verfärbte Reaktionsgemisch wurde nach 3 min auf eine Chromabond C18 Säule (1 g Säulenmaterial, Macherey-Nagel) gegeben und 3 x mit 4 ml Wasser gewaschen. Eluiert wurde mit je 4 ml Wasser-Methanolgemisch. Fraktion A: 25 % MeOH, B: 50 % MeOH, C: 75 % MeOH, D: 100 % MeOH. Die Fraktionen wurden vereinigt und die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der schwarzblaue, unlösliche, pigmentartige Rückstand wurde in 1 ml Methanol suspendiert und für MALDI-Messungen verwendet. Die Probe (2 µl) wurde auf der Probenzielplatte aus Edelstahl mit 2 µl DHAP/DAHC (2,6-dihydroxyacetophenon, Sigma, 15 mg/ml in 3:1 v/v Ethanol:aq. Diammoniumhydrogencitrat, Sigma, 10 mM) als Matrix vereinigt. Nach Trocknen der Lösungen wurde diese auf einem UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF Massenspektrometer über einen smartbeam-IITM Laser mit 1000 Hz (Bruker Daltonics) vermessen. Dieses wurde im Reflektormodus und positiver Polarisierung in einem Massenbereich von m/z 800 – 4500 (mit aktiviertem Deflektionsmodus ab m/z 500), PIE (Pulsed Ion Extraktion, Gepulste Ionenextraktion) Verzögerung von 130 ns während vollständig manuellem Messmodus unter Benutzung der flexControl-Software v.3.0 vermessen. Die Analytik fand bei 72 % Laserintensität (Lasertyp 3) statt. Dabei wurden insgesamt 10000 Impulse, bei 250 zufälligen Impulsen in jeder Rasterposition, appliziert. Die externe Kalibrierung wurde mit dem Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics) durchgeführt.

4.2 Arbeiten an *Agaricus bisporus*

Das in *Agaricus bisporus* vorkommende Agaritin kann von einer pilzeigenen Glutamytransferase/hydrolase in Glutamin und 4-Hydroxymethylphenylhydrazin gespalten werden (Gigliotti und Levenberg 1964). Diese Reaktion ist vermutlich der Schlüsselschritt hin zu weitaus reaktiveren Molekülen wie Diazoniumderivaten, welche vermutlich stark mutagen wirken (Walton *et al.* 1997, siehe Abb. 11). Da bisher lediglich die native Glutamytransferase/hydrolase charakterisiert wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit auch die heterolog produzierte Glutamytransferase/hydrolase charakterisiert werden.

4.2.1 Ergebnisse

Inhaltsstoffe aus *Agaricus bisporus*

Neben Agaritin konnte auch das γ -Glutaryl-4-Hydroxyanilin in Extrakten aus *Agaricus bisporus* über seine Masse identifiziert werden. Eine weitere Reinigung des Agaritins verlief aufgrund seiner Instabilität nicht erfolgreich. Daher wurde nur das γ -Glutaryl-4-Hydroxyanilin weiter gereinigt, um in späteren Enzymassays verwendet zu werden (siehe Kapitel 4.2.2).

Der Glutamytransferaseassay

In dem Assay mit heterolog produzierter Glutamytransferase konnte sowohl mit Glu1 als auch mit Glu2 ein leichter Umsatz von γ -Glutaryl Hydroxyanilin und Phenylhydrazin zu γ -Glutaryl-Phenylhydrazin beobachtet werden (Abb. 35, Abb. 36). Der Umsatz lag bei ca. 15 % für Glu1 und 5 % für Glu2. Allerdings konnte dieser Umsatz nur einmalig gezeigt und nicht reproduziert werden.

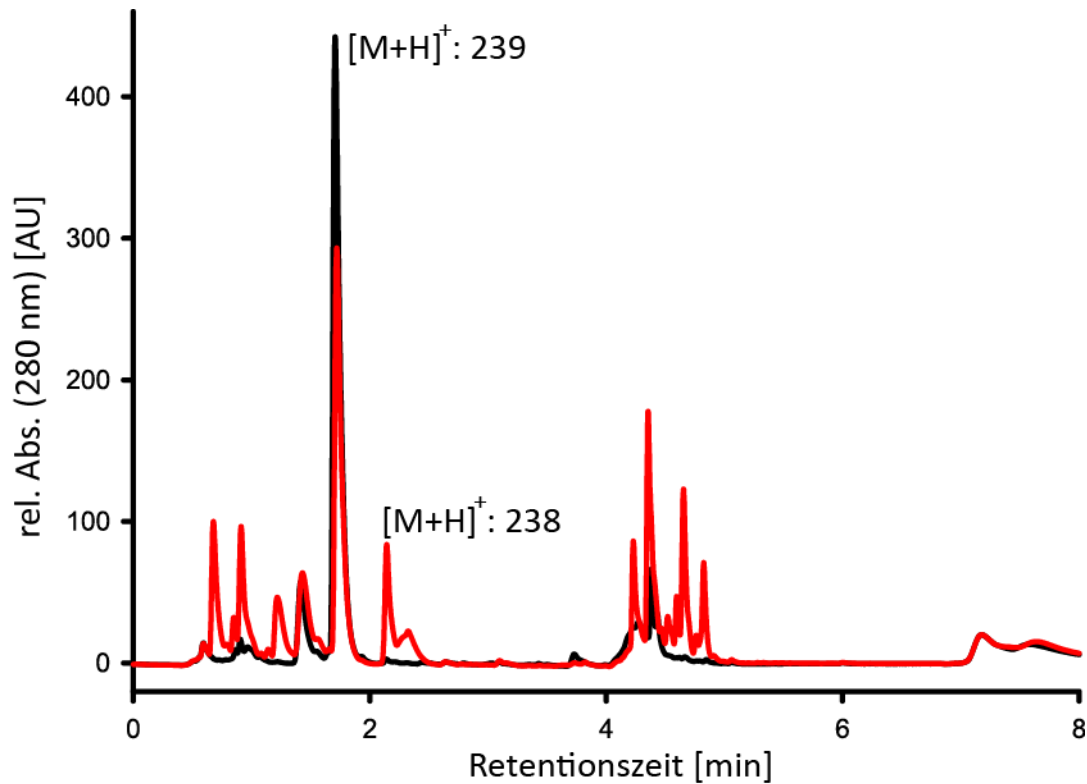


Abbildung 35: UPLC-Profil des Assayextraktes des Glutamytransferaseassays mit Glu1. Im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) kann in der Probe (rot) ein leichter Umsatz von γ -Glutaryl Hydroxyanilin (1,9 min) zu γ -Glutaryl Phenylhydrazin (RT 2,1 min) beobachtet werden. Weitere Signale in der Probe konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Der ohne Standardkurven schwer zu quantifizierende Umsatz lag allein durch Beurteilung durch die Peakflächen bei ca. 15 %.

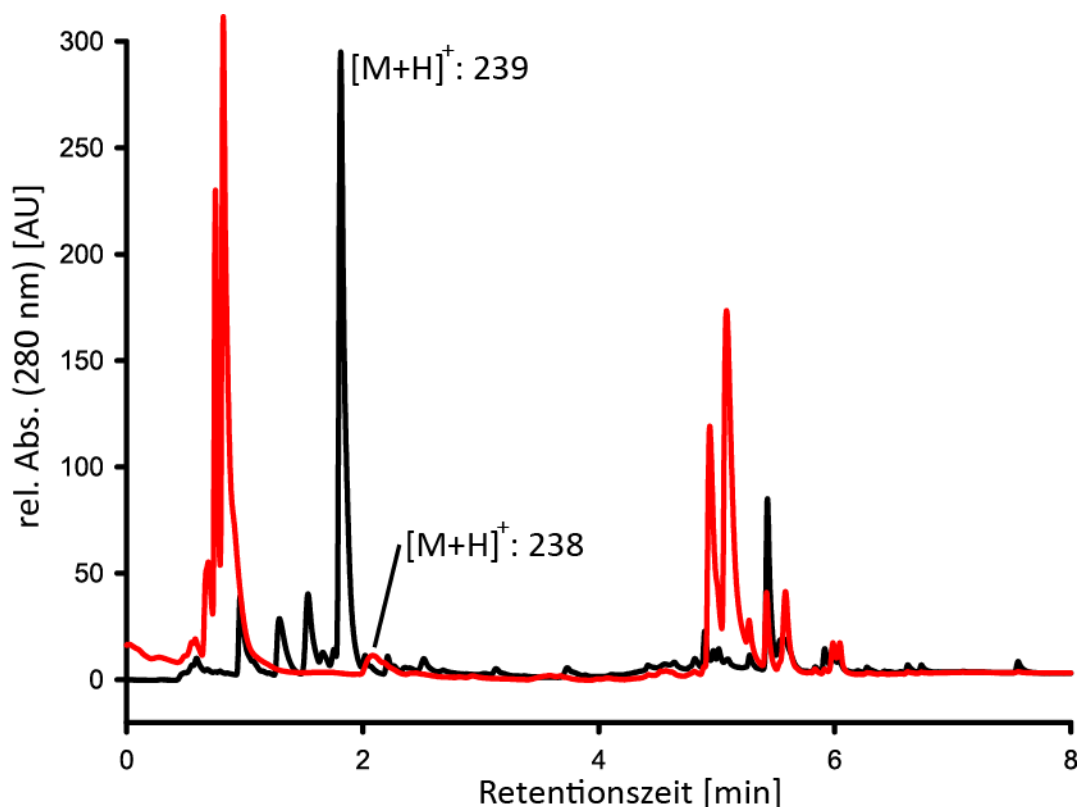


Abbildung 36: UPLC-Profil des Assayextraktes des Glutamyltransferaseassays mit Glu2. Im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) kann in der Probe (rot) ein leichter Umsatz von γ -Glutamyl Hydroxyanilin (1,9 min) zu γ -Glutamyl Phenylhydrazin (RT 2,1 min) beobachtet werden. Weitere Signale in der Probe konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Der ohne Standardkurven schwer zu quantifizierende Umsatz lag allein durch Beurteilung durch die Peakflächen bei ca. 5 %.

4.2.2 Methoden

400 g kommerziell erworbene Fruchtkörper von *Agaricus bisporus* wurden gefriergetrocknet, gemörsert und wie für Fruchtkörper von *Psilocybe cubensis* beschrieben extrahiert (siehe Kapitel 4.1.2). Zur Fraktionierung des Rohextraktes wurde mittels HPLC fraktioniert. Es wurden 5-10 ml eingespritzt und ein isokratischer Lauf bei 20 ml/min von 5 % Acetonitril und 95 % Wasser auf einer XDB-C8 Säule (21,2 x 250 mm) gefahren. Die einzelnen Fraktionen wurden per UPLC-MS analysiert. Das ACN der Fraktion mit dem höchsten γ -Glutamyl-p-hydroxyanilinanteil wurde unter vermindertem Druck entfernt, der wässrige Rückstand eingefroren und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 500 μ l Wasser aufgenommen und mittels semipräparativer HPLC weiter gereinigt. Hierfür wurde die Säule Eclipse XDB-C18 (Agilent, 9,4 x 250 mm; 5 μ m Partikelgröße) verwendet. Es wurden bis zu 50 μ l eingespritzt und bei einem Lauf von 2 ml/min isokratisch bei 5 % ACN und 95 % Wasser fraktioniert. Die

Fraktionen wurden mittels UPLC-MS analysiert. Die Fraktion mit dem γ -Glutamyl-p-hydroxyanilin hatte eine Reinheit von mehr als 95 %. Das ACN in der Fraktion wurde unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde die Probe eingefroren, lyophilisiert, der Rückstand in Wasser aufgenommen und für die Produktbildungsassays verwendet

Zur Analytik der Extrakte aus *Agaricus bisporus* sowie der Enzymassays mit Glu1/Glu2 wurde die UPLC 1290 Infinity II gekoppelt an die MS 6130 Quadropole LC/MS (Agilent) ausgestattet mit einer ESI-Ionisationsquelle, verwendet. Auf der Luna Omega Polar C18 (Partikelgröße 1,6 μm ; Säulendimension 50 x 2,1 mm, Phenomenex) wurden 1-4 μl des Analyten gegeben und mit Wasser +0,1 % FA (A) sowie Acetonitril +0,1 % FA (B) eluiert. Hierfür wurde ein Gradient von 1 % B auf 10 % B in 3 min, gefolgt von einem Gradienten von 10 % B auf 100 % B in 3 min gewählt.

Das Genom von *Agaricus bisporus* ist vollständig sequenziert, war bereits über bioinformatische Methoden annotiert und lag auf der Internetseite des Joint Genome Institute vor (Morin 2012, Nordberg 2014). Über die gezielte Suche nach codierenden Sequenzen für eine Glutamyltransferase wurden zwei Kandidaten gefunden. (ProtID 189871 und 204527). Für die vermutete cDNA-Sequenz wurden Primer für die folgenden molekularbiologischen Arbeiten entworfen.

Tab. 20: Liste der verwendeten Primer II.

Bezeichnung	Verwendung	Basenfolge	Schnittstelle	T _m [°C]
oJW15	Glu1 F	<u>CATATGATGCATCCGATGGGTTTCCTG</u>	<i>NdeI</i>	68
oJW16	Glu1 R	<u>CTCGAGCTAATAGCCCGCCGC</u>	<i>XhoI</i>	67
oJW17	Glu2 F	<u>CATATGATGACATCGAAGATAAAAATTGACTGGG</u>	<i>NdeI</i>	69
oJW18	Glu2 R	<u>GGATCCCTATATCTGCGCAGCTGC</u>	<i>BamHI</i>	69

Tab. 21: Liste der verwendeten Plasmide II.

Name	Länge des Inserts [bp]	Vektor	Beschreibung
pJW13	1815	pJet 1.2	<i>glu1</i> in pJet 1.2 ligiert
pJW14	1761	pJet 1.2	<i>glu2</i> in pJet 1.2 ligiert
pJW16	1815	pET28a	<i>glu1</i> in pET28a ligiert
pJW18	1761	pET28a	<i>glu2</i> in pET28a ligiert

Heterologe Glutamyltransferaseproduktion in *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli* BL 21 DE-Zellen zur Produktion von Glu1 und Glu2 wurden mit den Plasmiden pJW16 bzw. pJW18 transformiert. Zur Selektion wurden LB-Platten mit Kanamycin (50 µg/ml) verwendet.

Zur Anzucht von *E. coli* BL 21 DE-Zellen wurden 3x400 ml AI-Medium mit transformierten Zellen angeimpft. Es wurde bei 37 °C bei 180 rpm inkubiert und nach Erreichen einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0.4-0.5 weitere 18 h bei 16 °C bei 180 rpm inkubiert. (Zur Proteinextraktion und analog zur Reinigung siehe Kapitel 4.1.2: „Transformation und heterologe Proteinproduktion in *E. coli*“).

***In-vitro* Assay Glutamyltransferase**

Das Eluat wurde auf TRIS (100 mM, pH 8) umgepuffert und mittels Amicon-Fliter (10 kDa cutoff) ca. 3 x aufkonzentriert.

Von dieser Enzymfraktion wurden je 90 µl mit 4 µl γ-Glutamyl-p-hydroxyanilin (25 mM in H₂O, Endkonzentration 1 mM) und 1 µl Phenylhydrazin (100 mM in H₂O, Endkonzentration 1 mM) für 18 h bei RT inkubiert. Als Kontrolle diente eine bei 95 °C für 10 min hitzeinaktivierte Proteinfraktion.

Die Reaktion wurde durch Einfrieren beendet, der Assayansatz lyophilisiert und anschließend in Wasser (+ 0.1 % Ameisensäure) gelöst und mittels UPLC-MS analysiert.

5 Diskussion

Eine Vielzahl pilzlicher Naturstoffe werden von nichtmodularen Biosyntheseenzymen gebildet. Zu diesen gehören die unter Kapitel 1.4 erwähnten Verbindungen Psilocybin, Pityriacitrin, Betalain und Muscarin sowie das in Publikation 4 beschriebene Hypaphorin.

Das Auffinden der codierenden Sequenzen gerade dieser Biosyntheseenzyme gestaltet sich aufgrund fehlender Homologien zu konservierten Bereichen, welche in modularen Biosyntheseenzymen oft vorhanden sind, schwierig. Die ohnehin geringe Zahl bereits charakterisierter Biosyntheseenzyme aus Basidiomyceten verhindert ein schnelles Finden ähnlicher codierender Sequenzen. Auch das Identifizieren von Biosyntheseclustern ermöglicht oft kein komplettes Aufklären einer Biosynthese. Einzelne Gene, welche für an einer Biosynthese beteiligte Enzyme codieren, können, wie in dieser Arbeit gezeigt, auch außerhalb der Cluster liegen. Zusätzliche Schwierigkeiten bei der Kultivierung sowie fehlende etablierte Protokolle zur genetischen Manipulation erfordern oft eine Vielzahl unterschiedlichster Methoden zur Aufklärung der Biosynthesewege von Naturstoffen aus Basidiomyceten.

Obwohl alle der im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Basidiomyceten der Ordnung der Agaricales angehören, zeigte sich ein diverses Spektrum an Biosynthesewegen. Aus der Untersuchung dieser Biosynthesewege ergaben sich zudem Fragen zur Ökologie vor allem in Bezug auf die chemische Verteidigung der untersuchten Basidiomyceten.

5.1 Biosynthese der Melleolide

Dank immer schnellerer und genauerer Methoden zur DNA-Sequenzierung liegen die genomischen Daten von immer mehr Basidiomyceten vor (siehe Kapitel 1.4.1). Auch werden mit jedem neu charakterisierten Biosyntheseenzym die Annotationsalgorithmen immer genauer. Somit können annotierte Genome in bestimmten Fällen schnell auf putative Biosyntheseenzyme hin untersucht werden. Allerdings ist die Datenlage für charakterisierte Enzyme im Falle der Basidiomyceten nach wie vor äußerst dürftig. Man ist, wie im Fall der Halogenasen aus *Armillaria mellea*, von Vorhersagemodellen, welche auf Daten aus weit entfernt verwandten Organismen basieren, abhängig. So basierte das Primerdesign zum Auffinden von *armH1* und *armH2*, zwei Gene aus *Armillaria mellea* welche für Halogenasen codieren, auf dem Primerdesign zum Screenen einer Actinomycetensammlung auf

Halogenasen (Misiak 2009, Hornung *et al.* 2007). In der Arbeit von Hornung basierte das Primerdesign auf konservierten Motiven flavinabhängiger Halogenasen, welche eine Präferenz für phenolische Substrate haben und erstmals in Bakterien nachgewiesen wurden (van Pée und Unversucht 2003). Somit waren sowohl das Vorkommen als auch die Ähnlichkeit der flavinabhängiger Halogenasen über Domänengrenzen hinweg von großem Vorteil. Nachdem die codierenden Sequenzen der beiden Halogenasen ArmH1 und ArmH2 bekannt waren, konnten die übrigen Gene *armH3-armH5* jedoch schnell im inzwischen publizierten Genom von *Armillaria mellea* gefunden werden. Auch zeigte sich, wie in Publikation 1 (Wick *et al.* 2016) beschrieben, dass die Unterteilung in Halogenasen, welche freies Substrat halogenieren, und solche, welche proteingebundenes Substrat umsetzen, nicht für ArmH1-ArmH5 zutrifft. Auch die phylogenetischen Untersuchungen untermauern, dass es sich bei den Halogenasen aus Basidiomyceten um eine eigenständige, von flavinabhängigen Halogenasen aus Bakterien oder Ascomyceten zu unterscheidende Gruppe innerhalb der Gruppe der flavinabhängigen Halogenasen handelt. Mit den nun vorliegenden Sequenzen von *armH1-armH5* sollte es deutlich leichter fallen, in Genomen von Basidiomyceten für flavinabhängige Halogenasen codierende Gensequenzen zu identifizieren - gerade da Basidiomyceten eine Quelle für biologisch aktive, halogenierte Naturstoffe darstellen (Field, 1995). Die Fütterung und Analytik von Kulturen von *Armillaria mellea* mit Bromid und Iodid führten zu Hinweisen, dass auch diese neben Chlor in Melleolide eingebaut werden können (Misiak 2009). Daraufhin wurde, wie in Publikation 1 beschrieben, der *in-vitro*-Halogenierungsassays auch mit Bromid und Iodid durchgeführt. So konnte die erfolgreiche enzymatische Bromierung des nicht-halogenierten Melleolides Melleolid F zu vermutlich 6'-Brom-Melleolid F gezeigt werden (vergleiche auch Abb. 7).

5.2 Biosynthese des Psilocybins und des blauen Farbstoffes

Über Fütterungsversuche konnte eine komplette Biosynthese des Psilocybins vorgeschlagen werden (Brack *et al.* 1961, Agurell und Nilsson 1968), jedoch ohne die beteiligten Biosyntheseenzyme zu charakterisieren. Unlängst konnte die komplette Biosynthese des Psilocybins mit allen beteiligten Enzymen aufgeklärt werden. Über den Vergleich der genomischen Sequenz von drei entfernt verwandten psilocybinproduzierenden Pilzen (*Psilocybe cyanescens*, *Gymnopilus dilepis* und *Panaeolus cyanescens*) untereinander sowie mit drei verwandten nicht-psilocybinproduzierenden Pilzen konnte ein putativer

Psilocybinbiosynthese Gencluster gefunden werden (Reynolds *et al.* 2018). Dieser Cluster beinhaltete codierende Sequenzen für eine Decarboxylase, eine Methyltransferase, eine Hydroxylase und eine Phosphotransferase. Dies sind genau die Enzyme, welche für eine Biosynthese des Psilocybins, ausgehend von Tryptophan nötig wären. Auch die tatsächliche biosynthetische Abfolge und Charakterisierung aller beteiligten Biosyntheseenzyme konnte für *P. cubensis* gezeigt werden (Fricke *et al.* 2017). Aufbauend auf diesen Arbeiten kann nun auch neben der Anzucht und Extraktion psilocybinhaltiger Pilze sowie der chemischen Synthese des Psilocybins auch die biotechnologische Synthese des Psilocybins ermöglicht werden (Fricke *et al.* 2018, Publikation 3).

Über die Extraktion von *P. serbica* und *P. cubensis* wurden zunächst eine Vielzahl putativer Biosynthesezwischenprodukte des Psilocybins untersucht. Mehrere Indolderivate, welche Teil einer nichtlinearen, über mehrere biosynthetische Zwischenschritte verlaufenden Biosynthese des Psilocybins sein könnten, konnten in Kulturextrakten nachgewiesen werden. Das Vorkommen des Norpsilocins (Publikation 2, Lenz *et al.* 2017) kann beispielsweise von keiner der vorgeschlagenen Biosyntheserouten erklärt werden: Während die von Agurell und Nilsson vorgeschlagene Biosynthese von Tryptophan über Tryptamin, N-Methyltryptamin, N,N-Dimethyltryptamin, und Psilocin verläuft, schlagen Fricke und Blei eine Biosynthese über Tryptamin, 4-Hydroxytryptamin, Norbaeocystin und Baecocystin vor (siehe Abb. 8).

Gleichzeitig sollten aber keine voreiligen Schlüsse aus dem Nachweis bestimmter Substanzen aus Kulturextrakten gezogen werden. So ist das Vorkommen von N-Methyl-L-tryptophan und N, N-Dimethyl-L-tryptophan in Kulturextrakten von *P. serbica* wahrscheinlich nicht Teil der Biosynthese des Psilocybins, sondern vielmehr der des Hypaphorins (Blei *et al.*, Publikation 4). Auch die Art der Extraktionsmethode sollte kritisch hinterfragt werden. Wie in Publikation 2 ersichtlich, führen bestimmte Extraktionsmethoden psilocybinhaltiger Pilze zu deutlicher Dephosphorylierung und somit zu einem Umsatz von Psilocybin zu Psilocin sowie Baecocystin zu Norpsilocin. Ist der Wasseranteil während der Extraktion psilocybinhaltiger Pilze zu hoch, kann auch ein schneller, enzymatisch bedingter Umsatz von Psilocybin zu dem blauen Farbstoff beobachtet werden. Das tatsächliche und beobachtete Metabolom kann sich so deutlich unterscheiden. Diese Befunde führten zu einer sehr schonenden Trocknung und Aufarbeitung der verwendeten Biomasse zum Zwecke der Metabolomuntersuchungen in dieser Arbeit.

In dieser Arbeit wurde der Ansatz verfolgt, über die auf Enzymassays basierende aktivitätsgeleitete Fraktionierung nativen Proteins sowie über Verdau und Analytik der einzelnen Fraktionen mittels HRMS, putative Biosyntheseenzyme zu identifizieren. Dies führte für die hier vorgestellte Tryptophandecarboxylase und Psilocinkinase nicht zum Erfolg, da diese nicht mit den publizierten Biosyntheseenzymen übereinstimmen. Zu Beginn dieser Arbeit war nur eine Aromatische-L-Aminosäure Decarboxylase aus dem Basidiomyceten *Ceriporiopsis subvermispora* charakterisiert worden (Kalb *et al.* 2016). Inzwischen ist auch die an der Psilocybinbiosynthese beteiligte Tryptophandecarboxylase bekannt (Fricke 2017). Die gefundene Tryptophandecarboxylase (TDC) hat nur eine geringe Ähnlichkeit zu den bereits beschriebenen TDC's PsiD und CstDC (siehe Kapitel 4.1.1). Dies ist insofern interessant, als dass es sich bei der gefundenen TDC um den Vertreter einer neuen Familie von TDC's aus Basidiomyceten handeln könnte.

Phosphorylierte Sekundärmetabolite sind äußerst selten, bekannte Vertreter sind neben Psilocybin die beiden bakteriellen Sekundärmetabolite Calyculin und Paeninodin (Wakimoto *et al.* 2014, Zhu *et al.* 2016) sowie die Phoslactomycine, Leustroducsins und das Fostriecin aus *Streptomyces* spp. (Palaniappan *et al.* 2003). Zu den in dieser Arbeit gefundenen Kinasen lagen somit wenige bis keine eng verwandten, charakterisierten Enzyme vor. Es ist daher möglich, dass es sich bei den gefundenen Kinasen tatsächlich um Kinasen aus dem Primärstoffwechsel, wie zum Beispiel um eine Glucosaminkinase oder Adenosinkinase handelt. Der geringe Umsatz von Psilocin zu Psilocybin könnte somit Ergebnis des Umsatzes eines schlecht akzeptierten Fehlsubstrates sein, welches dennoch unter den im *in-vitro*-Assay herrschenden Bedingungen umgesetzt wird.

Über die aktivitätsgeleitete Fraktionierung nativen Proteins und die Analytik der nach Verdau erhaltenen Peptidfragmente konnte eine Phosphatase identifiziert werden, welche Psilocybin zu Psilocin umsetzt, sowie eine Laccase, welche Psilocin zu einem blauen Farbstoff umsetzt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass, wie in Kapitel 1.3.1 bereits angedacht, Psilocybin nicht das Endprodukt dieser Biosynthese, sondern einen Speicherstoff darstellen könnte, während das eigentliche Endprodukt der blaue Farbstoff wäre. Dieses neue, putative Endprodukt könnte so die Frage der ökologischen Bedeutung der Psilocybin- und weiterführenden Biosynthese des blauen Farbstoffes klären.

Die zwei gefundenen Psilocybin-Phosphatasen zeigen eine große Ähnlichkeit zu pilzlichen Phytasen. Diese katalysieren die Freisetzung von Phosphat aus Phytat (*myo*-Inositol

Hexakisphosphat). Aufgrund des Einsatzes von Phytasen als Zusatz in Tierfutter sind diese recht gut beforscht. Während Daten zur Substratspezifität von Phytasen aus Basidiomyceten nur zu ein- oder mehrfach dephosphoryliertes Phytat vorliegen, konnte eine große Akzeptanz phosphorylierter Substrate durch Phytasen aus Ascomyceten gezeigt werden (Lassen *et al.* 2001, Wyss *et al.* 1999).

Die Oxidation von Psilocin zu dem blauen Farbstoff wird von einer Laccase katalysiert. Laccasen gehören zu den Sauerstoff-Oxidoreductasen, sie reduzieren Sauerstoff zu Wasser, während ein Substrat oxidiert wird. Dabei ist die Bandbreite der von Laccasen akzeptierten Substrate sehr groß, umfasst in der Regel aber phenolähnliche Substrate. Die bedeutendsten von Laccasen katalysierten Reaktionen umfassen sowohl die radikalvermittelte Ligninsynthese in Pflanzen als auch umgekehrt den radikalvermittelten Ligninabbau durch Pilze. So konnten in nahezu allen holzzersetzenden Basidiomyceten Laccasen nachgewiesen werden (Baldrian 2006). Wie schon in Kapitel 1.1 ausgeführt, ist die Fähigkeit von Basidiomyceten, Lignin abzubauen von sehr großer ökologischer Bedeutung. Aus diesem Grund gehören Laccasen zu den am besten untersuchten Enzymfamilien aus Basidiomyceten. So liegen Daten zu 33 annotierten und überprüften Laccasen aus Basidiomyceten vor (uniprot.org, abgerufen am 18.05.2018). Dies ist umso beeindruckender, da die heterologe Produktion pilzlicher Laccasen aufgrund des hohen Glycosylierungsgrades von typischerweise zwischen 15-25 % äußerst schwierig ist (Baldrian 2006). Daher wurden Laccasen aus Basidiomyceten meist in *Saccharomyces cerevisiae* oder *Aspergillus* spp. heterolog produziert (Piscitelli *et al.* 2010). Jedoch konnte auch eine Laccase aus *Cyathus bulleri* erfolgreich in *E. coli* heterolog produziert werden (Salony *et al.* 2008).

Neben der großen ökologischen Bedeutung der Laccasen finden diese aufgrund ihrer Enzymstabilität und ihres breiten Substratspektrums auch Anwendung in der organischen Synthese und in Bioremediationsprozessen (Kunamneni *et al.* 2008, Martínková *et al.* 2016). Die Oxidation von Psilocin durch eine Laccase ist auch dadurch sehr plausibel, da das mit Psilocin strukturell eng verwandte 4-Hydroxyindol ein sehr gutes Substrat für Laccasen aus *Pycnoporus cinnabarinus* und *Coriolus hirsutus* darstellt (Eggert *et al.* 1996).

Die Struktur des blauen Farbstoffes ist nach wie vor unbekannt. Die Ergebnisse der MALDI-Analytik deuten jedoch auf ein Polymer hin, welches in oxidiertem, reduziertem oder einer Mischform vorliegt. Für Bufotenin konnte keine Polymerisation, sondern nur eine Dimerisierung beobachtet werden. Geht man von der klassischen Oxidation an der

phenolischen Hydroxylgruppe aus, ergeben sich unterschiedliche Positionen, an denen ein erzeugtes Radikal im Ring stabilisiert vorliegen kann (Abb. 37, Abb. 38). Dabei folgt der Radikalbildungsschritt an der phenolischen Hydroxylgruppe vermutlich einem für Laccasen typischen Mechanismus, während dem über einen Reduktionsschritt über vier Elektronen molekularer Sauerstoff zu Wasser umgesetzt wird (Jones, Solomon 2015).

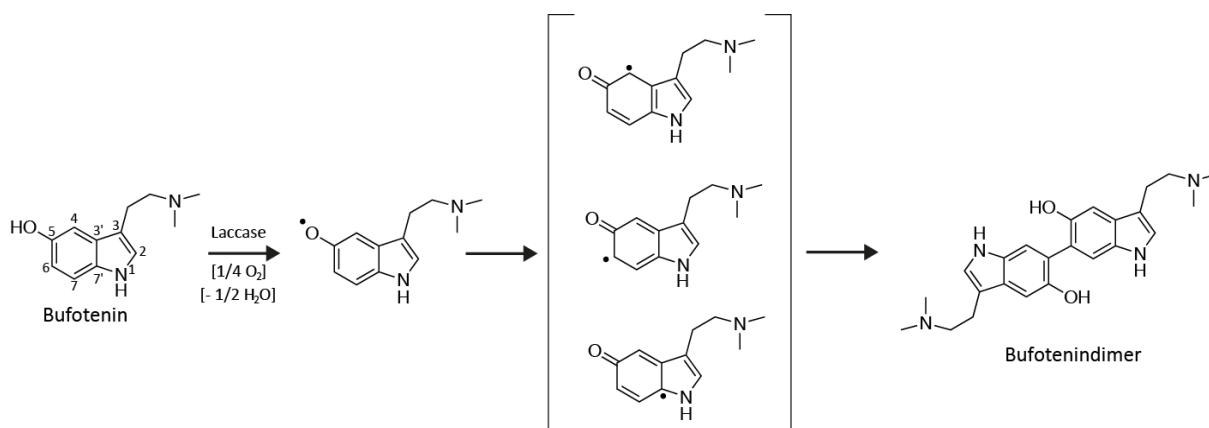


Abbildung 37: Putative, enzymatisch vermittelte oxidative Dimerisierung von Bufotenin. Das durch die Laccase generierte Radikal kann an drei Positionen innerhalb des Ringsystems (an Position 4, 6 und 7') vorliegen. An diesen Positionen kann eine Verknüpfung zu einem weiteren Bufoteninmolekül stattfinden. Vermutlich ist an Position 7' eine Verknüpfung aus sterischen Gründen wenig wahrscheinlich. Tri-, Oligo- oder Polymere des Bufotenins konnten nicht beobachtet werden (siehe Abb. 31).

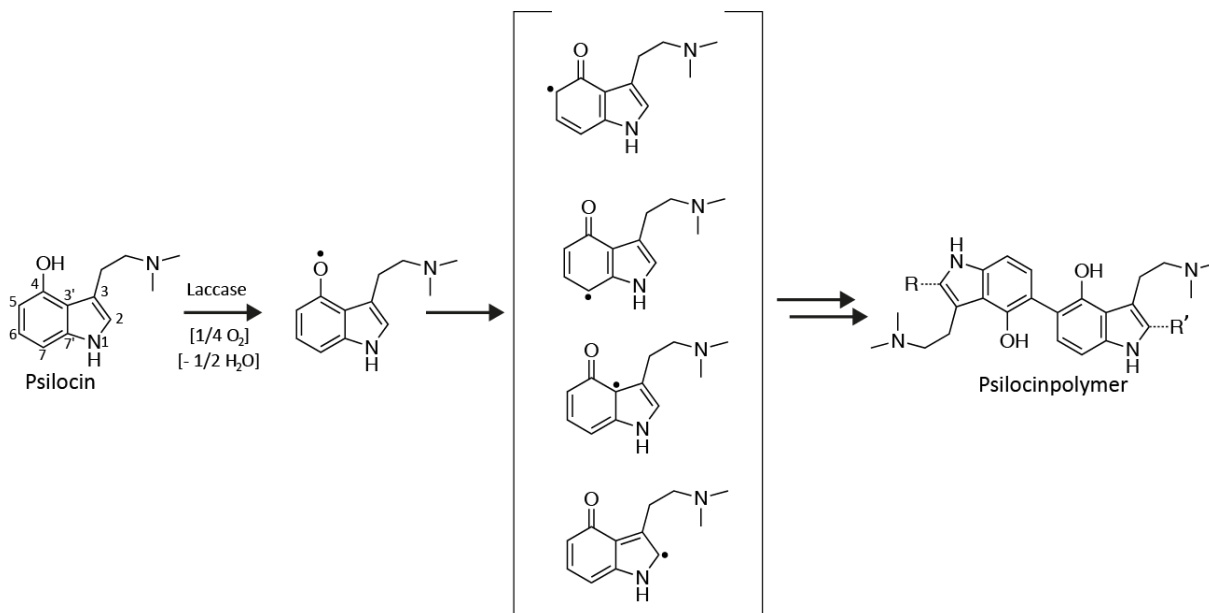


Abbildung 38: Putative, enzymatisch vermittelte oxidative Polymerisation von Psilocin. Das durch die Laccase generierte Radikal kann an vier Positionen innerhalb des Ringsystems (an Position 2, 3', 5 und 7) vorliegen. An diesen Positionen kann eine Verknüpfung zu einem weiteren Psilocinmolekül stattfinden. Vermutlich ist an Position 3' eine Verknüpfung aus sterischen Gründen wenig wahrscheinlich.

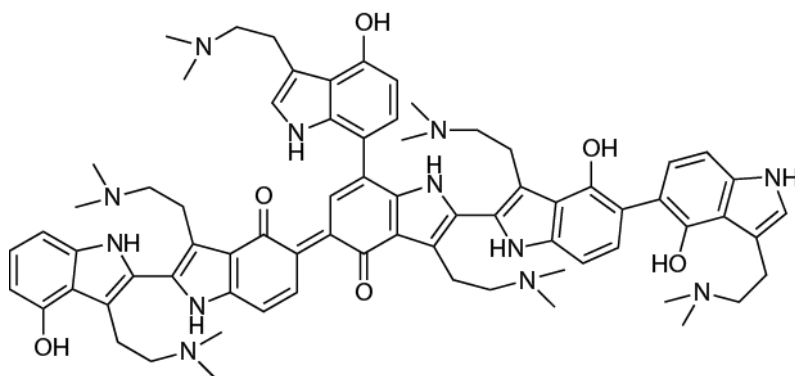


Abbildung 39: Putatives Psilocinhexamer. An diesem werden alle vermuteten Verknüpfungen und Oxidationszustände beispielhaft aufgeführt.

Aus Abb. 38 werden mögliche Verknüpfungspunkte für eine radikalische Polymerisierung des Psilocins ersichtlich. An Positionen 3a und 7a ist eine Verknüpfung aus sterischen Gründen unwahrscheinlich. Psilocin verfügt über eine zusätzliche Verknüpfungsstelle im Vergleich zu Bufotenin (Abb. 37), was vermutlich der Grund für die Polymerisierung des Psilocins im Vergleich zur Dimerisierung des Bufotenins ist. Beispielhaft ist in Abb. 39 ein mögliches Psilocin-Hexamer mit allen wahrscheinlichen Verknüpfungen und Oxidationszuständen zu sehen. Die vorgeschlagene Struktur steht in gutem Einklang mit bereits vorgeschlagenen Strukturen des blauen Farbstoffes. So schlug Laatsch ein an der 5'-Position verknüpft Dimer chinoider Struktur vor (Laatsch 1998). Neben der oxidierten wurde auch eine reduzierte Form vorgeschlagen, diese wurden „Psindigo“ bzw. „Leukopsindigo“ genannt (Trout, 2007).

Unabhängig davon, über welche Positionen verknüpft oder in welchem Oxidationszustand der an den Sauerstoff gebundene Kohlenstoff vorliegt, ist das gesamte Molekül immer komplett durchkonjugiert. Dies ist ein wichtiger Faktor für die Stabilisierung von Radikalen und möglichen radikalfangenden Eigenschaften. Ein Beispiel für ähnliche Indolderivate aus Pilzen mit radikalfangenden Eigenschaften sind zwei 6'-hydroxylierte Indolderivate aus *Agrocybe cylindracea*. Für diese konnte die Inhibierung von Lipidperoxidation in Rattenlebermikrosomen nachgewiesen werden. Nichthydroxylierte Indole zeigten diesen Effekt nicht (Kim *et al.* 1997).

Um Aussagen zur genaueren theoretischen Funktion des blauen Psilocinpolymers treffen zu können, lässt es sich auch mit ähnlichen, antioxidativen Systemen wie Flavonoiden, Phenolen und Polyphenolen (Tanninen) aus Pflanzen vergleichen (Leopoldini *et al.* 2004, Rice-Evans *et al.* 1996). Denn eben jene antioxidativen und radikalfangenden Substanzen können je nach umgebendem Milieu auch radikalerzeugend wirken. Es wird vermutet, dass die schädliche Wirkung dieser Stoffe auf Insekten unter anderem auf der Erzeugung reaktiver

Sauerstoffspezies (ROS) im Verdauungstrakt beruht. Da das vorherrschende Milieu dort in der Regel basisch und oxidierend ist, wirken Polyphenole radikal- und ROS- erzeugend, was zu Läsionen im Verdauungstrakt der Insekten führen kann (Barbehenn und Constabel 2011).

Für das blaue Oxidationsprodukt des Psilocins könnte ein ähnlicher Wirkmechanismus vorliegen, da die vermutete radikalische Bildung zu einer Polymerstruktur führt welche strukturelle und funktionelle Nähe zu Polyphenolen vorweist. Auch das blaue Oxidationsprodukt könnte je nach Umgebung radikalstabilisierende bzw. erzeugende Eigenschaften vorweisen. Eine weitere Gemeinsamkeit des blauen Farbstoffes und Tanninen sind Hinweise auf ihre proteinbindenden und –fällenden Eigenschaften (Levine, 1967).

Reynolds *et al.* (2018) vermuten in ihrer Publikation einen hohen Selektionsvorteil der Basidiomyceten, welche dank horizontalem Gentransfer über den Psilocybinbiosynthese Gencluster verfügen. Der Selektionsvorteil durch Psilocybin soll auf dessen schädliche, neuromodulative Wirkung auf Insekten, welche zu den typischen holzabbauenden Konkurrenten dieser Pilze gehören, zurückzuführen sein. Die Annahme eines neuromodulativen Wirkmechanismus beruht auf Beobachtungen des pilzlichen Parasiten *Ophiocordyceps unilateralis* welcher einige Ameisenarten befällt und diese dazu bringt, ihr Nest zu verlassen und sich in höhergelegene Pflanzenteile zu verbeißen. Anschließend stirbt die Ameise, der Pilz wächst aus deren Kadaver und sporuliert. Zwei aus dem Pilz isolierte Stoffe mit putativ neuromodulativer Wirkung zeigten jedoch *in vivo* keine Verhaltensänderung der Ameisen (de Bekker *et al.* 2014).

Es liegt jedoch nahe, dass der Selektionsvorteil durch die Psilocybinsynthese vielmehr auf die bei Verletzung auftretende Bildung des blauen Farbstoffes zurückgeht. Zunächst fällt zwar auf, dass weder die Phosphatase noch die Laccase, welche Psilocybin zu dem blauen Farbstoff umsetzen, in dem Biosynthese Gencluster vorhanden sind. Trotzdem zeigen nahezu alle psilocybinenthaltenden Pilze eine Blaufärbung bei Verletzung. Da Phosphatasen, insbesondere phytaseähnliche, sowie Laccasen ein breites Substratspektrum vorweisen und in nahezu allen saprotrophen Pilzen vorkommen, ist ein horizontaler Gentransfer für die codierenden Sequenzen nicht nötig. Es genügt der Transfer des Psilocybingenclusters, die weitere Umsetzung ist durch die Substratspezifität und Abundanz der Phosphatasen und Laccasen gewährleistet. Tatsächlich zeigen die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Phosphatasen und die Laccase eine hohe Ähnlichkeit zu hypothetischen Proteinen aus den

psilocybinproduzierenden Pilzen *Psilocybe cyanescens*, *Panaeolus cyanescens* und *Gymnopilus dilepis*. Diese hypothetischen Proteine stellen daher sehr wahrscheinlich die in den jeweiligen Pilzen an der Blaufärbung beteiligten Phosphatasen und Laccasen dar.

Zusätzlich erscheint die potentielle Wirkung des blauen Farbstoffes als Erzeuger von ROS im Verdauungstrakt von Fraßfeinden aus oben genannten Gründen naheliegender als eine neuromodulative Wirkung. Trotzdem lässt sich die Hypothese von Reynolds, dass die Psilocybinsynthese einen starken Selektionsvorteil für saprotrophe Pilze bedeutet, gut mit der vermuteten Toxizität des blauen Farbstoffes vereinbaren. Gerade Insekten, welche sich von Detritus und Humus ernähren, also die ökologische Nische psilocybinhaltiger Pilze bewohnen, weisen ein äußerst alkalisches, oxidierendes Milieu in ihren Verdauungsorganen auf, was die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch den blauen Farbstoff begünstigen könnte (Šustr *et al.* 2014). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Xylophagen oft zwingend auf eine ergänzende mycophage Ernährungsweise angewiesen sind, um den Bedarf an bestimmten, im Holz kaum vorkommenden, essentiellen Elementen zu decken (Filipiak *et al.* 2016). Dephosphorylierung und Oxidation zu dem blauen Produkt konnte auch mit Proteinextrakten aus Ratten erreicht werden. Dabei zeigte sowohl die putative Phosphatase als auch die putative Oxidase eine Präferenz für basische Bedingungen (Horita und Weber 1961).

Die Beobachtungen zur Unlöslichkeit und proteinbindenden Eigenschaft des blauen Farbstoffes sowie die Tatsache, dass Psilocin eine im Menschen wirksame Substanz ist, zeigen, dass im Menschen zwar die Dephosphorylierung, nicht aber die weitere Oxidation stattfindet (Carhart-Harris *et al.* 2011). Dies scheint plausibel, da der menschliche Verdauungstrakt zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies über ein komplexes Redoxsystem verfügt, welches ein reduzierendes Milieu schafft (Circu und Aw 2011).

Um weitere Aussagen über die Struktur des blauen Farbstoffes treffen zu können, würde sich ein *in-situ* NMR Experiment anbieten. Dabei würde die enzymatische Reaktion im NMR-Probenröhrchen durchgeführt werden. Zeitaufgelöste Messungen würden im Idealfall das Verschwinden bestimmter Protonensignale darstellen, was Rückschlüsse auf mögliche Verknüpfungsstellen der Monomere zuließe. Um eine mögliche ökologische Rolle des blauen Farbstoffes zu untersuchen, böten sich Fraßversuche mit geeigneten Insekten an.

5.3 Arbeiten an *Agaricus bisporus*

Die Schwierigkeit, Agaritin aus *Agaricus bisporus* zu reinigen, führte zu dem Ausweichen auf γ -Glutamyl-4-Hydroxyanillin, um die Glutamyltransferase/hydrolase zu charakterisieren. Zukünftige Arbeiten könnten möglicherweise auch mit Xanthodermin aus *Agaricus xanthodermus* erfolgen (Hilbig *et al.* 1985). Dieses unterscheidet sich strukturell lediglich durch eine Hydroxylgruppe anstelle einer Hydroxymethylgruppe vom Agaritin (siehe Abb. 10). Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft wäre Xanthodermin vermutlich auch als Substrat für die Glutamyltransferase/hydrolase in Frage gekommen. Somit konnte über die Analytik einfacher Pilzextrakte das Vorkommen strukturell ähnlicher Stoffe in verschiedenen Pilzen der gleichen Gattung gezeigt werden. Auch hier muss jedoch bei dem Vergleich der Metabolome die Art der Extraktion in Betracht gezogen werden. Beschriebene Inhaltsstoffe aus *Agaricus xanthodermus* konnten in späteren Publikationen als artifizielle Nebenprodukte, welche während der Extraktion und Aufarbeitung entstehen, identifiziert werden (Gill und Strauch 1984, Hilbig *et al.* 1985).

Die zwei codierenden Sequenzen für die Glutamyltransferasen aus *Agaricus bisporus* waren bereits annotiert worden. Ziel war nun eine zusätzliche Charakterisierung der Proteine über einen *in-vitro* Protuktbildungsassay mit γ -Glutamyl-4-hydroxyanillin- und Phenylhydrazin als Substrate. Jedoch war hier die Bildung von γ -Glutamylphenylhydrazin aufgrund seiner Reaktivität schwer zu beobachten. Insgesamt konnte kein stabiles Assaysystem zur Charakterisierung der beiden Glutamyltransferasen etabliert werden.

In *Agaricus*-Arten scheinen die Glutamyl-Phenylhydrazinderivate durch enzymatische Reaktionen in mutagene Substanzen umgesetzt zu werden. Während Agaritin nur eine schwache mutagene Wirkung zeigt, führt die Inkubation mit einer γ -Glutamyltransferase zu einer deutlichen Erhöhung und das putative Endprodukt des Agaritins, das Diazonium-Derivat, zeigte die höchste mutagene Wirkung (Fredrich *et al.* 1986, siehe Abb. 11). Der Nachweis sowohl des freien Hydrazins als auch des Diazoniumderivates als Produkte in Enzymassays mit Agaritin erwies sich auch in anderen Arbeiten als äußerst schwierig, was vermutlich auf die hohe Reaktivität dieser Stoffe zurückzuführen ist. Zusätzlich zur aktivierenden Wirkung der Glutamyltransferase konnte auch eine aktivierende Wirkung einer fungalen Tyrosinase gezeigt werden (Walton *et al.* 1997, Walton *et al.* 2001). Interessanterweise könnte die aktivierende Wirkung auch von einer Laccase herrühren, da gezeigt wurde, dass die von Walton

verwendete, kommerziell erhältliche fungale Tyrosinase mit einer solchen verunreinigt war (Sugumaran und Bolton 1998). In zukünftigen Arbeiten könnte man schnell überprüfen, ob auch in *Agaricus xanthodermus* eine mit *Agaricus bisporus* verwandte Glutamyltransferase/hydrolase vorkommt.

5.4 Verteidigungsmechanismen in Basidiomyceten

Die in dieser Arbeit untersuchten Sekundärmetabolite, die Melleolide aus *Armillaria mellea*, das Psilocybin und der blaue Farbstoff aus *P. cubensis* und schließlich das Agaritin bzw. dessen Folgeprodukte aus *Agaricus bisporus*, scheinen alle eine Rolle in der chemischen Abwehr dieser Pilze zu spielen. Melleolide befinden sich zu jedem Zeitpunkt in dem Mycelium und den Rhizomorphen von *Armillaria mellea*, es liegt daher ein konstitutiver chemischer Abwehrmechanismus vor. Die Abwehrstoffe in *Psilocybe cubensis* und *Agaricus bisporus* werden erst bei Verletzung enzymatisch aus Vorläufermolekülen (Psilocybin bzw. Agaritin) gebildet, was einer wundaktivierten chemischen Verteidigung entspricht. Ein Beispiel für den letzten Verteidigungsmechanismus, die induzierte chemische Verteidigung, wäre die Biosynthese eines Abwehrstoffes, welche erst durch Verletzung induziert wird. Ein Beispiel dafür wäre der Verteidigungsmechanismus in dem Basidiomyceten BY1 (Brandt *et al.* 2017). Gerade für konstitutive und wundinduzierte Abwehrmechanismen gibt es inzwischen eine Vielzahl von Beispielen aus Basidiomyceten, wie beispielsweise das Vorkommen von Strobilurin I in *Mycena sanguinolenta* sowie die Bildung von Blausäure ausgehend von Aleurodisconitril bei Verletzung von *Aleurodiscus amorphus* (Spiteller 2008).

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Biosynthese bestimmter Sekundärmetabolite aus verschiedenen Vertretern von Basidiomyceten der Ordnung Agaricales zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wurde auf die Entwicklung von Strategien zur Aufklärung von Biosynthesewegen vor dem Hintergrund der besonderen Schwierigkeiten bei der Arbeit mit Basidiomyceten gelegt.

Es wurde gezeigt, dass ein schneller Überblick über das pilzliche Metabolom durch die Analytik pilzlicher Extrakte gewährleistet werden kann. Einerseits können durch die inzwischen sehr genaue Spurenanalytik putative Biosyntheseintermediate gefunden werden. Diese erlauben erste Rückschlüsse auf die Biosynthese eines Stoffes und grenzen Zahl und Funktion putativer Biosyntheseenzyme ein. Andererseits muss beachtet werden, dass vermeintliche Biosynthesezwischenprodukte nicht unbedingt Teil des zu untersuchenden Biosyntheseweges, sondern Produkte eines weiteren sein können. Außerdem muss beachtet werden, dass während des Prozessierens (Lagerung, Trocknung etc.) und der Extraktion pilzlicher Biomasse sowohl enzymatische als auch chemische Reaktionen das ursprüngliche Metabolom stark verfälschen können. So konnte in Publikation 2 (Lenz *et al.* 2017) der starke Einfluss der Extraktionsmethode auf das vermeintliche Metabolom gezeigt werden. Frühere Literaturangaben zum Psilocingehalt in psilocybinhaltigen Pilzen sind vermutlich daher leicht verfälscht. Des Weiteren konnte mithilfe eines schonenden Extraktionsprotokolles im Zuge dieser Arbeit Norpsilocin als Naturstoff identifiziert werden.

Es wurden Strategien erläutert, gängige Methoden zur Aufklärung von Biosynthesewegen in anderen Organismen, welche für Basidiomyceten nicht, nur in Ausnahmefällen oder nur mit äußerstem Material- und Zeitaufwand zu bewerkstelligen sind, durch alternative Methoden der Biosyntheseaufklärung zu ersetzen. Innerhalb dieser Arbeit waren dies hauptsächlich die Reinigung und Analytik nativer Proteine, von denen eine Beteiligung an einem Biosyntheseweg vermutet wurde. Dies Art des Vorgehens wurde zur Charakterisierung putativer, an der Psilocybinbiosynthese und an der weiteren Umsetzung des Psilocybins zu einem blauen Farbstoff beteiligter Enzyme angewandt. Nach diesem Vorgehen wurden Psilocinkinasen und eine Tryptophandecarboxylase gefunden. Diese sind nach neueren Erkenntnissen jedoch nicht Teil der Psilocybinbiosynthese. Zwei gefundene Phosphatasen und eine Laccase hingegen setzen Psilocybin zu einem blauen Polymer um. Dieser Umsatz sowie

die Strukturanalytik des blauen Farbstoffes ergaben Hinweise auf eine mögliche ökologische Funktion des Psilocybins als Fraßschutz.

Aber auch die Identifizierung putativer Biosynthesenzyme über die vergleichende Suche nach deren codierenden Sequenzen innerhalb der jeweiligen Genome *in silico* stellte eine in manchen Fällen brauchbare Strategie dar. Unbestreitbar haben Fortschritte in der Sequenzieretechnik und der *in silico* Analytik die Aufklärung von Biosynthesewegen stark vereinfacht. So konnte, wie in Publikation 1 (Wick *et al.* 2016) beschrieben, mit den zuvor gefundenen für zwei Halogenasen codierenden Sequenzen in *Armillaria mellea* drei weitere für Halogenasen codierende Sequenzen gefunden werden. Alle zugehörigen Halogenasen sind an der Biosynthese der toxischen Melleolide beteiligt.

Auch in dem sequenzierten und annotierten Genom von *Agaricus bisporus* konnten die codierenden Sequenzen für zwei putative Glutamytransferasen gefunden und diese genauer charakterisiert werden. Es ergaben sich Hinweise auf eine Beteiligung dieser Glutamytransferasen an dem Umsatz des in *Agaricus bisporus* vorkommenden Naturstoffes Agaritin zu einem Diazoniumderivat, welches vermutlich auch Teil eines Verteidigungsmechanismus ist.

Wie in Kapitel 5 dargestellt, lassen sich die in dieser Arbeit bearbeiteten Projekte und Befunde gut in die chemische Abwehr von Basidiomyceten einordnen. Die Melleolide, der blaue Farbstoff als Folgeprodukt des Psilocybins und das Diazoniumderivat als Folgeprodukt des Agaritins sind vermutlich Teil der chemischen Abwehr in den untersuchten Basidiomyceten der Ordnung Agaricales.

7 Referenzen

1. Adl, S.M., et al., *The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists*. J Eukaryot Microbiol, 2005. **52**(5): p. 399-451.
2. Agger, S., F. Lopez-Gallego, and C. Schmidt-Dannert, *Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete Coprinus cinereus*. Mol Microbiol, 2009. **72**(5): p. 1181-95.
3. Agurell, S. and J.L. Nilsson, *Biosynthesis of psilocybin. II. Incorporation of labelled tryptamine derivatives*. Acta Chem Scand, 1968. **22**(4): p. 1210-8.
4. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
5. Bailey, A.M., et al., *Identification and manipulation of the pleuromutilin gene cluster from Clitopilus passeckerianus for increased rapid antibiotic production*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 25202.
6. Baldrian, P., *Fungal laccases - occurrence and properties*. FEMS Microbiol Rev, 2006. **30**(2): p. 215-42.
7. Baldrian, P. and V. Valaskova, *Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(3): p. 501-21.
8. Barbehenn, R.V. and C. Peter Constabel, *Tannins in plant-herbivore interactions*. Phytochemistry, 2011. **72**(13): p. 1551-1565.
9. Baumgartner, K., M.P. Coetzee, and D. Hoffmeister, *Secrets of the subterranean pathosystem of Armillaria*. Mol Plant Pathol, 2011. **12**(6): p. 515-34.
10. Béguiristain, T. and F. Lapeyrie, *Host plant stimulates hypaphorine accumulation in Pisolithus tinctorius hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development*. New Phytologist, 1997. **136**(3): p. 525-532.
11. Bishop, K.S., et al., *From 2000 years of Ganoderma lucidum to recent developments in nutraceuticals*. Phytochemistry, 2015. **114**: p. 56-65.
12. Blaschko, H. and W.G. Levine, (a), *Enzymic oxidation of psilocine and other hydroxyindoles*. Biochemical Pharmacology, 1960. **3**(2): p. 168-169.
13. Blaschko, H. and W.G. Levine, (b), *A comparative study of hydroxyindole oxidases*. Br J Pharmacol Chemother, 1960. **15**(4): p. 625-33.
14. Blei, F., et al., *Iterative L-tryptophan methylation in Psilocybe evolved by sub-domain duplication*. ChemBioChem, 2018.
15. Boa, E., *Wild Edible Fungi: A Global Overview of Their Use and Importance to People*. 2004.
16. Bohnert, M., et al., *Cytotoxic and antifungal activities of melleolide antibiotics follow dissimilar structure-activity relationships*. Phytochemistry, 2014. **105**: p. 101-108.
17. Boratyn, G.M., et al., *Domain enhanced lookup time accelerated BLAST*. Biol Direct, 2012. **7**: p. 12.
18. Brack, A., et al., *Tryptophan als biogenetische Vorstufe des Psilocybins*. Archiv der Pharmazie, 1961. **294**(4): p. 230-234.
19. Braesel, J., et al., *Biochemical and genetic basis of orsellinic acid biosynthesis and prenylation in a steraceous basidiomycete*. Fungal Genetics and Biology, 2017. **98**: p. 12-19.
20. Brakhage, A.A., *Regulation of fungal secondary metabolism*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(1): p. 21-32.
21. Brandenburger, E., et al., *A highly conserved basidiomycete peptide synthetase produces a trimeric hydroxamate siderophore*. Appl Environ Microbiol, 2017.
22. Brandt, P., et al., *Induced Chemical Defense of a Mushroom by a Double-Bond-Shifting Polyene Synthase*. Angew Chem Int Ed Engl, 2017. **56**(21): p. 5937-5941.
23. Brundrett, M.C., *Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants*. New Phytologist, 2002. **154**(2): p. 275-304.
24. Capasso, L., *5300 years ago, the Ice Man used natural laxatives and antibiotics*. The Lancet. **352**(9143): p. 1864.

25. Carhart-Harris, R.L., et al., *The administration of psilocybin to healthy, hallucinogen-experienced volunteers in a mock-functional magnetic resonance imaging environment: a preliminary investigation of tolerability*. J Psychopharmacol, 2011. **25**(11): p. 1562-7.
26. Circu, M.L. and T.Y. Aw, *Redox biology of the intestine*. Free Radic Res, 2011. **45**(11-12): p. 1245-66.
27. Collins, C., et al., *Genomic and proteomic dissection of the ubiquitous plant pathogen, Armillaria mellea: toward a new infection model system*. J Proteome Res, 2013. **12**(6): p. 2552-70.
28. Dayan, F.E., C.L. Cantrell, and S.O. Duke, *Natural products in crop protection*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009. **17**(12): p. 4022-4034.
29. de Bekker, C., et al., *Species-specific ant brain manipulation by a specialized fungal parasite*. BMC Evolutionary Biology, 2014. **14**(1): p. 166.
30. De Silva, D.D., et al., *Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry*. Fungal Diversity, 2013. **62**(1): p. 1-40.
31. Ditengou, F.A., M. Raudaskoski, and F. Lapeyrie, *Hypaphorine, an indole-3-acetic acid antagonist delivered by the ectomycorrhizal fungus Pisolithus tinctorius, induces reorganisation of actin and the microtubule cytoskeleton in Eucalyptus globulus ssp bicostata root hairs*. Planta, 2003. **218**(2): p. 217-25.
32. Donnelly, D., et al., *Isolation and structure (X-ray analysis) of the orsellinate of armillol, a new antibacterial metabolite from Armillaria mellea*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1982(2): p. 135-137.
33. Du, Q., H. Wang, and J. Xie, *Thiamin (Vitamin B1) Biosynthesis and Regulation: A Rich Source of Antimicrobial Drug Targets?* International Journal of Biological Sciences, 2011. **7**(1): p. 41-52.
34. Eggert, C., U. Temp, and K.E. Eriksson, *The ligninolytic system of the white rot fungus Pycnoporus cinnabarinus: purification and characterization of the laccase*. Appl Environ Microbiol, 1996. **62**(4): p. 1151-8.
35. Engels, B., *Untersuchungen zur Biosynthese sesquiterpenoider Naturstoffe, der Melleolide, in Armillaria gallica*. 2013: RWTH Aachen.
36. Engels, B., et al., *Cloning and characterization of an Armillaria gallica cDNA encoding protoilludene synthase, which catalyzes the first committed step in the synthesis of antimicrobial melleolides*. J Biol Chem, 2011. **286**(9): p. 6871-8.
37. Field, J.A., F.J.M. Verhagen, and E. de Jong, *Natural organohalogen production by basidiomycetes*. Trends in Biotechnology, 1995. **13**(11): p. 451-456.
38. Filipiak, M., Ł. Sobczyk, and J. Weiner, *Fungal Transformation of Tree Stumps into a Suitable Resource for Xylophagous Beetles via Changes in Elemental Ratios*. Insects, 2016. **7**(2): p. 13.
39. Firn, R.D. and C.G. Jones, *A Darwinian view of metabolism: molecular properties determine fitness*. J Exp Bot, 2009. **60**(3): p. 719-26.
40. Fredrich, U., et al., *The mutagenic activity of agaritine — a constituent of the cultivated mushroom Agaricus bisporus — and its derivatives detected with the Salmonella/mammalian microsome assay (Ames Test)*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1986. **183**(2): p. 85-89.
41. Fricke, J., F. Blei, and D. Hoffmeister, *Enzymatic Synthesis of Psilocybin*. Angewandte Chemie International Edition, 2017. **56**(40): p. 12352-12355.
42. Fricke, J., et al., *Production options for psilocybin - the making of the magic*. Chemistry – A European Journal, 2018.
43. Funayama, S., Cordell, G. A., *Alkaloids*. 2015: Academic Press.
44. Gartz, J., *Biotransformation of tryptamine derivatives in mycelial cultures of Psilocybe*. J Basic Microbiol, 1989. **29**(6): p. 347-52.
45. Gartz, J., *Further Investigations on Psychoactive Mushrooms of the Genera Psilocybe, Gymnopilus and Conocybe*. Ann. Mus. civ. Rovereto, 1991. **7**: p. 265 - 274.

46. Gigliotti, H.J. and B. Levenberg, *Studies on the Gamma-Glutamyl Transferase of Agaricus bisporus*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 2274-84.
47. Gill, M. and R.J. Strauch, *Constituents of Agaricus xanthodermus Genevier: the first naturally endogenous azo compound and toxic phenolic metabolites*. Z Naturforsch C, 1984. **39**(11-12): p. 1027-9.
48. Gressler, M., et al., *A new high-performance heterologous fungal expression system based on regulatory elements from the Aspergillus terreus terrein gene cluster*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 184.
49. Guillaumin, J.J., et al., *Geographical distribution and ecology of the Armillaria species in western Europe*. European Journal of Forest Pathology, 1993. **23**(6-7): p. 321-341.
50. Hallen, H.E., et al., *Gene family encoding the major toxins of lethal Amanita mushrooms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(48): p. 19097-101.
51. Hartmann, T., *The lost origin of chemical ecology in the late 19th century*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(12): p. 4541.
52. Hatakka, A. and K.E. Hammel, *Fungal Biodegradation of Lignocelluloses*, in *Industrial Applications*, M. Hofrichter, Editor. 2011, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 319-340.
53. Hautbergue, T., et al., *From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites*. Natural Product Reports, 2018. **35**(2): p. 147-173.
54. Hibbett, D.S., et al., *A higher-level phylogenetic classification of the Fungi*. Mycological Research, 2007. **111**(5): p. 509-547.
55. Hilbig, S., et al., *Zur Chemie und antibiotischen Aktivität des Carbolegerlings (Agaricus xanthoderma)*. Angewandte Chemie 1985. **97**(12): p. 1063-1064.
56. Hinz, U.G., et al., *The gene coding for the DOPA dioxygenase involved in betalain biosynthesis in Amanita muscaria and its regulation*. Mol Gen Genet, 1997. **256**(1): p. 1-6.
57. Hofmann, A., et al., *Psilocybin und Psilocin, zwei psychotrope Wirkstoffe aus mexikanischen Rauschpilzen*. Helvetica Chimica Acta, 1959. **42**(5): p. 1557-1572.
58. Högberg, M.N. and P. Högberg, *Extramatrix ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil*. New Phytologist, 2002. **154**(3): p. 791-795.
59. Horita, A. and L.J. Weber, *Dephosphorylation of Psilocybin to Psilocin by Alkaline Phosphatase*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1961. **106**(1): p. 32-34.
60. Hornung, A., et al., *A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources*. ChemBiochem, 2007. **8**(7): p. 757-66.
61. Ishiuchi, K., et al., *Establishing a new methodology for genome mining and biosynthesis of polyketides and peptides through yeast molecular genetics*. ChemBiochem, 2012. **13**(6): p. 846-54.
62. Jadot, J., J. Casimir, and M. Renard, *Séparation et caractérisation du l(+)-γ-(p-hydroxy) anilide de l'acide glutamique à partir de Agaricus hortensis*. Biochimica et Biophysica Acta, 1960. **43**: p. 322-328.
63. Jensen, N., *Attempted Molecular Cloning of Enzymes from the Psilocybin Biosynthesis Pathway in Psilocybe tampanensis*. 1999: Universität Regensburg.
64. Jensen, N., J. Gartz, and H. Laatsch, *Aeruginascin, a trimethylammonium analogue of psilocybin from the hallucinogenic mushroom Inocybe aeruginascens*. Planta Med, 2006. **72**(7): p. 665-6.
65. Johnson, J.B., *The elements of Mazatec witchcraft*. Elander Göteborg, 1939.
66. Johnson, M.W. and R.R. Griffiths, *Potential Therapeutic Effects of Psilocybin*. Neurotherapeutics, 2017. **14**(3): p. 734-740.
67. Jones, S.M. and E.I. Solomon, *Electron Transfer and Reaction Mechanism of Laccases*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2015. **72**(5): p. 869-883.
68. Kalac, P., *A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms*. J Sci Food Agric, 2013. **93**(2): p. 209-18.

69. Kalb, D., J. Gressler, and D. Hoffmeister, *Active-Site Engineering Expands the Substrate Profile of the Basidiomycete L-Tryptophan Decarboxylase CsTDC*. ChemBioChem, 2016. **17**(2): p. 132-136.
70. Kall, L., A. Krogh, and E.L. Sonnhammer, *A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method*. J Mol Biol, 2004. **338**(5): p. 1027-36.
71. Kilaru, S., P.J. Hoegger, and U. Kues, *The laccase multi-gene family in Coprinopsis cinerea has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies*. Curr Genet, 2006. **50**(1): p. 45-60.
72. Kim, W.G., et al., *New indole derivatives with free radical scavenging activity from Agrocybe cylindracea*. J Nat Prod, 1997. **60**(7): p. 721-3.
73. Kumar, S.V., et al., *Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family*. Biotechnol Bioeng, 2003. **83**(4): p. 386-94.
74. Kunamneni, A., et al., *Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis*. Microbial Cell Factories, 2008. **7**(1): p. 32.
75. Laatsch, H., *Untersuchungen an Psilocybe-Arten zur Blaufärbung und zur Biosynthese der Alkaloide*. Jahrbuch des Europäischen Collegiums für Bewusstseinsstudien 1997, Verlag für Wissenschaft und Bildung, 1998: p. 241-256.
76. Lackner, G., et al., *Assembly of melleolide antibiotics involves a polyketide synthase with cross-coupling activity*. Chem Biol, 2013. **20**(9): p. 1101-6.
77. Lackner, G., et al., *Genome mining reveals the evolutionary origin and biosynthetic potential of basidiomycete polyketide synthases*. Fungal Genetics and Biology, 2012. **49**(12): p. 996-1003.
78. Lambers, H., et al., *Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age*. Trends Ecol Evol, 2008. **23**(2): p. 95-103.
79. Lassen, S.F., et al., *Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: Peniophora lycii, Agrocybe pediades, a Ceriporia sp., and Trametes pubescens*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(10): p. 4701-7.
80. Lenz, C., J. Wick, and D. Hoffmeister, *Identification of omega-N-Methyl-4-hydroxytryptamine (Norpsilocin) as a Psilocybe Natural Product*. J Nat Prod, 2017. **80**(10): p. 2835-2838.
81. Leopoldini, M., et al., *Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism*. The Journal of Physical Chemistry, 2004 **108** (22): p. 4916-4922.
82. Leung, A.Y. and A.G. Paul, *Baeocystin and norbaeocystin: new analogs of psilocybin from Psilocybe baeocystis*. J Pharm Sci, 1968. **57**(10): p. 1667-71.
83. Levenberg, B., *Structure and Enzymatic Cleavage of Agaritine, a Phenylhydrazide of L-Glutamic Acid Isolated from Agaricaceae*. J. Am. Chem. Soc., 1961. **83**: p. 503-504.
84. Levenberg, B., *Isolation and Structure of Agaritine, a Gamma-Glutamyl-Substituted Arylhydrazine Derivative from Agaricaceae*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 2267-73.
85. Levine, W.G., *Formation of Blue Oxidation Product from Psilocybin*. Nature, 1967. **215**: p. 1292.
86. Lopez-Gallego, F., et al., *Sesquiterpene synthases Cop4 and Cop6 from Coprinus cinereus: Catalytic promiscuity and cyclization of farnesyl pyrophosphate geometrical isomers*. Chembiochem : a European journal of chemical biology, 2010. **11**(8): p. 1093-1106.
87. Luo, H., et al., *Peptide macrocyclization catalyzed by a prolyl oligopeptidase involved in alpha-amanitin biosynthesis*. Chem Biol, 2014. **21**(12): p. 1610-7.
88. Martínková, L., et al., *Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review*. Chemosphere, 2016. **149**: p. 373-382.
89. Matsushima, Y., et al., *Historical overview of psychoactive mushrooms*. Vol. 29. 2009. 47-58.
90. Misiak, M., *Untersuchung der Armillariella biosynthese aus dem Phytopathogen Armillaria mellea zur einfachen Evaluation seiner Virulenz*. 2009: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.
91. Misiak, M. and D. Hoffmeister, *Fungal Genetics, Genomics, and Secondary Metabolites in Pharmaceutical Sciences*. Planta Med, 2007. **73**(02): p. 103-115.
92. Misiak, M., et al., *Structure and Cytotoxicity of Arniamial and Related Fungal Sesquiterpene Aryl Esters*. Journal of Natural Products, 2009. **72**(10): p. 1888-1891.

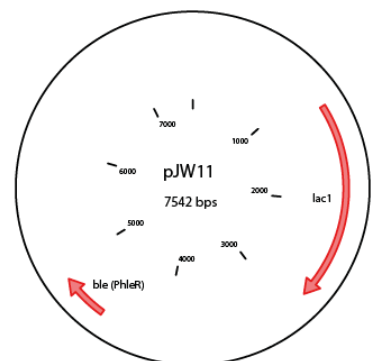
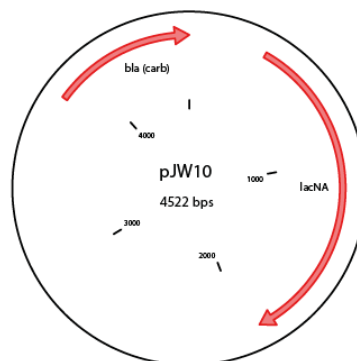
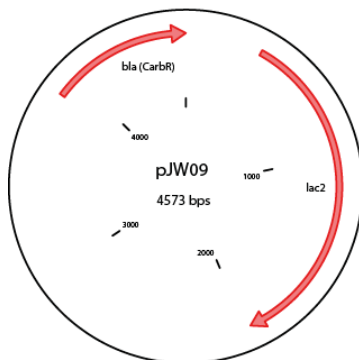
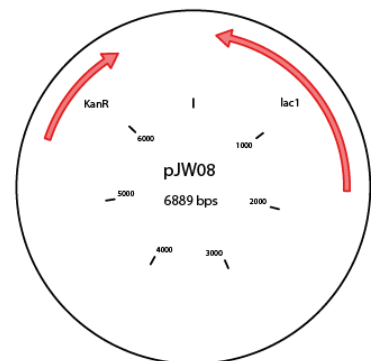
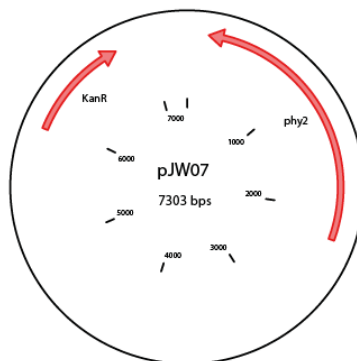
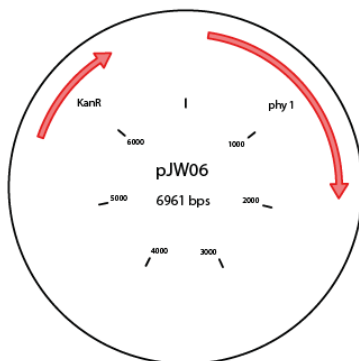
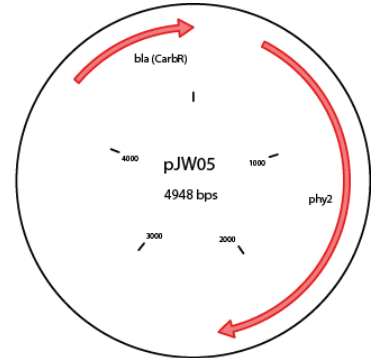
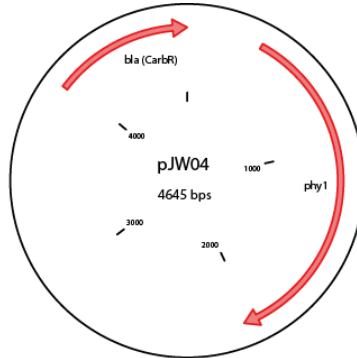
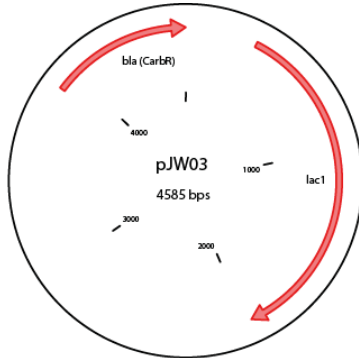
93. Morin, E., et al., *Genome sequence of the button mushroom Agaricus bisporus reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(43): p. 17501.
94. Moss, M.O., *Fungal Metabolites*, in eLS. 2011.
95. Nitta, K., R.J. Stadelmann, and C.H. Eugster, *Zur Biogenese des Muscarins in Mycelkulturen von Clitocybe rivulosa*. Helvetica Chimica Acta, 1977. **60**(5): p. 1747-1753.
96. Nordberg, H., et al., *The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D26-31.
97. O'Brien, J. and G.D. Wright, *An ecological perspective of microbial secondary metabolism*. Curr Opin Biotechnol, 2011. **22**(4): p. 552-8.
98. Palaniappan, N., et al., *Enhancement and selective production of phoslactomycin B, a protein phosphatase IIa inhibitor, through identification and engineering of the corresponding biosynthetic gene cluster*. J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 35552-7.
99. Peipp, H. and J. Sonnenbichler, *Secondary fungal metabolites and their biological activities, II. Occurrence of antibiotic compounds in cultures of Armillaria ostoyae growing in the presence of an antagonistic fungus or host plant cells*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1992. **373**(8): p. 675-83.
100. Piscitelli, A., et al., *Heterologous laccase production and its role in industrial applications*. Bioengineered Bugs, 2010. **1**(4): p. 252-262.
101. Quin, M.B., C.M. Flynn, and C. Schmidt-Dannert, *Traversing the fungal terpenome*. Nat Prod Rep, 2014. **31**(10): p. 1449-73.
102. Reuter, J.A., D. Spacek, and M.P. Snyder, *High-Throughput Sequencing Technologies*. Molecular cell, 2015. **58**(4): p. 586-597.
103. Reynolds Hannah, T., et al., *Horizontal gene cluster transfer increased hallucinogenic mushroom diversity*. Evolution Letters, 2018. **0**(0).
104. Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga, *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free Radic Biol Med, 1996. **20**(7): p. 933-56.
105. Rix, U., et al., *Modification of post-PKS tailoring steps through combinatorial biosynthesis*. Natural Product Reports, 2002. **19**(5): p. 542-580.
106. Ross, A.E., D.L. Nagel, and B. Toth, *Evidence for the occurrence and formation of diazonium ions in the Agaricus bisporus mushroom and its extracts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1982. **30**(3): p. 521-525.
107. Roupas, P., et al., *Mushrooms and agaritine: A mini-review*. Vol. 2. 2010. 91-98.
108. Saar, M., *Ethnomycological data from siberia and north-east asia on the effect of Amanita muscaria*. Journal of Ethnopharmacology, 1991. **31**(2): p. 157-173.
109. Safford, W.E., *An Aztec Narcotic*. Bureau of Plant Industry, United States Department of Agriculture, 1915.
110. Salony, et al., *Laccase of Cyathus bulleri: structural, catalytic characterization and expression in Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1784**(2): p. 259-68.
111. Sanchez, J.F., et al., *Advances in Aspergillus secondary metabolite research in the post-genomic era*. Nat Prod Rep, 2012. **29**(3): p. 351-71.
112. Saxena, S. and A.K. Pandey, *Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium*. Appl Microbiol Biotechnol, 2001. **55**(4): p. 395-403.
113. Schardl, C.L., D.G. Panaccione, and P. Tudzynski, *Ergot alkaloids--biology and molecular biology*. Alkaloids Chem Biol, 2006. **63**: p. 45-86.
114. Schultes, R.E., *Teonanacatl: The Narcotic Mushroom of the Aztecs*. American Anthropologist, 1940. **42**(3): p. 429-443.
115. Shaw, C.G., Kile, G. A., *Armillaria root disease*. Agriculture handbook. Washington, D.C. States Department of Agriculture, 1991: p. 691.
116. Simard, S.W., et al., *Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field*. Nature, 1997. **388**: p. 579.
117. Smith, D.J., et al., *Beta-lactam antibiotic biosynthetic genes have been conserved in clusters in prokaryotes and eukaryotes*. The EMBO Journal, 1990. **9**(3): p. 741-747.

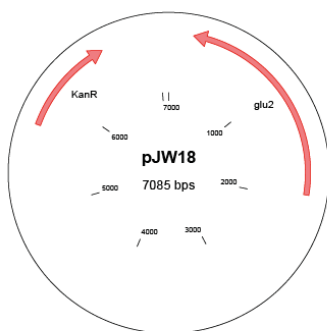
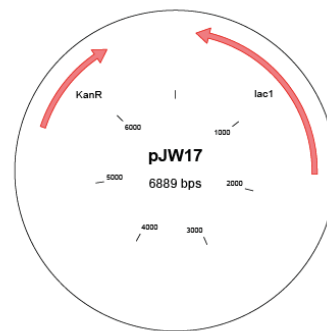
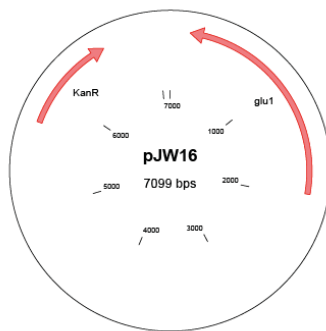
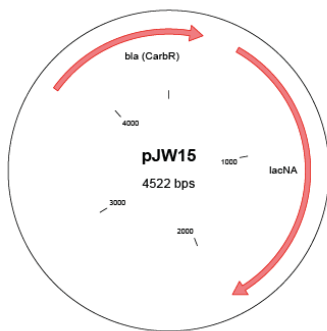
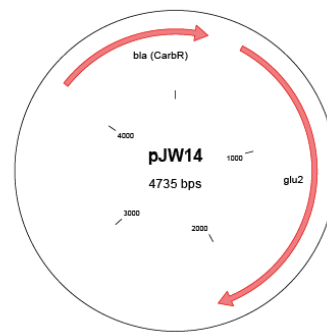
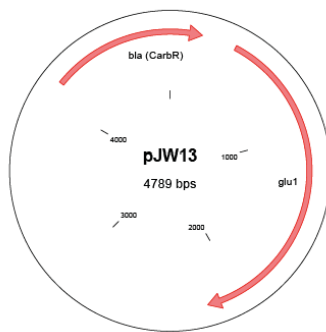
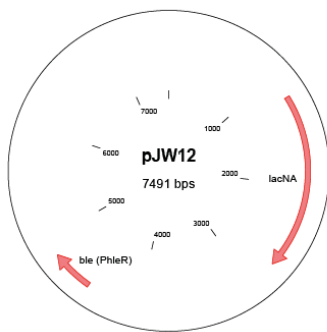
118. Smith, S.E. and D. Read, *Mycorrhizal Symbiosis (Third Edition)*. 2008, Academic Press: London. p. 1-9.
119. Song, Y.Y., et al., *Interplant Communication of Tomato Plants through Underground Common Mycorrhizal Networks*. PLOS ONE, 2010. **5**(10): p. e13324.
120. Spiteller, P., *Chemical defence strategies of higher fungi*. Chemistry, 2008. **14**(30): p. 9100-10.
121. Stadler, M. and D. Hoffmeister, *Fungal natural products-the mushroom perspective*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 127.
122. Stanke, M., et al., *AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**(suppl_2): p. W309-W312.
123. Stijve, T., *Bufotenine Concentrations in Carpophores of Amanita citrina* Trav. chim. aliment. hyg. , 1979. **70**: p. 246-253.
124. Sugumaran, M. and J.L. Bolton, *Laccase--and not tyrosinase--is the enzyme responsible for quinone methide production from 2,6-dimethoxy-4-allyl phenol*. Arch Biochem Biophys, 1998. **353**(2): p. 207-12.
125. Sustr, V., U. Stingl, and A. Brune, *Microprofiles of oxygen, redox potential, and pH, and microbial fermentation products in the highly alkaline gut of the saprophagous larva of Penthetria holosericea (Diptera: Bibionidae)*. J Insect Physiol, 2014. **67**: p. 64-9.
126. Trout, K., *Some Simple Tryptamines*. 2007.
127. Tsing, A.L., *The mushroom at the end of the world : on the possibility of life in capitalist ruins*. Princeton University Press, 2015.
128. Tyanova, S., et al., *Visualization of LC-MS/MS proteomics data in MaxQuant*. Proteomics, 2015. **15**(8): p. 1453-6.
129. Vaishnav, P. and A.L. Demain, *Unexpected applications of secondary metabolites*. Biotechnol Adv, 2011. **29**(2): p. 223-9.
130. Valverde, M., T. Hernández-Pérez, and O. Paredes-Lopez, *Review Article Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life*. Vol. 2015. 2015. 14.
131. van Pee, K.H. and S. Unversucht, *Biological dehalogenation and halogenation reactions*. Chemosphere, 2003. **52**(2): p. 299-312.
132. Wakimoto, T., et al., *Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont*. Nat Chem Biol, 2014. **10**(8): p. 648-55.
133. Walsh, C.T., et al., *Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines*. Curr Opin Chem Biol, 2001. **5**(5): p. 525-34.
134. Walton, K., et al., *Bioactivation of mushroom hydrazines to mutagenic products by mammalian and fungal enzymes*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1997. **381**(1): p. 131-139.
135. Walton, K., et al., *The metabolism and bioactivation of agaritine and of other mushroom hydrazines by whole mushroom homogenate and by mushroom tyrosinase*. Toxicology, 2001. **161**(3): p. 165-77.
136. Wang, X.M., et al., *A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China*. Food Chem, 2014. **151**: p. 279-85.
137. Wasson, V.P. and R.G. Wasson, *Mushrooms, Russia and History*. Pantheon Books, New York, 1957.
138. Wawrzyn, G.T., et al., *Draft genome of Omphalotus olearius provides a predictive framework for sesquiterpenoid natural product biosynthesis in Basidiomycota*. Chem Biol, 2012. **19**(6): p. 772-83.
139. Wick, J., et al., *A Fivefold Parallelized Biosynthetic Process Secures Chlorination of Armillaria mellea (Honey Mushroom) Toxins*. Appl Environ Microbiol, 2016. **82**(4): p. 1196-204.
140. Winterberg, B., et al., *Elucidation of the complete ferrichrome A biosynthetic pathway in Ustilago maydis*. Mol Microbiol, 2010. **75**(5): p. 1260-71.
141. Wyss, M., et al., *Biochemical Characterization of Fungal Phytases (myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties*. Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(2): p. 367-373.

142. Xu, W., D.J. Gavia, and Y. Tang, *Biosynthesis of fungal indole alkaloids*. Nat Prod Rep, 2014. **31**(10): p. 1474-87.
143. Yu, P.W., et al., *Identification of the orsellinic acid synthase PKS63787 for the biosynthesis of antroquinonols in Antrodia cinnamomea*. Appl Microbiol Biotechnol, 2017. **101**(11): p. 4701-4711.
144. Yu, P.-W., et al., *pks63787, a Polyketide Synthase Gene Responsible for the Biosynthesis of Benzenoids in the Medicinal Mushroom Antrodia cinnamomea*. Journal of Natural Products, 2016. **79**(6): p. 1485-1491.
145. Zhu, S., et al., *The B1 Protein Guides the Biosynthesis of a Lasso Peptide*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 35604.
146. Zuther, K., et al., *The tryptophan aminotransferase Tam1 catalyses the single biosynthetic step for tryptophan-dependent pigment synthesis in Ustilago maydis*. Mol Microbiol, 2008. **68**(1): p. 152-72.

8 Anhang

Vektorkarten





Gen- und Proteinsequenzen

Tryptophandecarboxylase TDC codierende Sequenz

ATGTCTGCCGAAAACTATCGCTAAACCTCGCTATCGTATTCCTACGAGTGAGGACCATGAACGCAC
ATCTGCTCTTTTCTTGGGTCCCAAGGCAGAAAAATGCCAAATTCCTCCGGAATGGTTGATGACGGTTG
TCTCTCAGCAAGAGGCAGCCCGCCATGCTTATTCCTCCGAAAGACAATATTTTTATTTCCGCCGCCACG
CAAAGCTCCAAAGCTTTTCGCGAGACTACGAACGCAATAACGAGCAACCTCACCGCGTTGTTGACTGA
ACTCGGTCAAAAATCAGTTCGGTCTACTCTCCCGGTACAGCGGCCATATGTCTGTAGACCAAAGTT
TGCCGGCCATTCTCGGGTATTTGTGACCTTGTTTTACAATCCCAACAATGTTGCCTTTGAGGCTAGT
CCGTTACGACTATCATCGAGGGAGAAGTTGGCTTGCAACTCTCTGAAATGCTGGGTATATAATCGTCT
GAATAACGTGGATGAACCTCTCGCCTGGGGACATATTGCATCGGGTGGTACTGTTGCAAACCTTGAAT
CAATGTGGGCGGCGCGCAACCTCAAGTTCTATCCTCTCTCGCTCCGAAATGCTTCGGCCAAAGGCGCA
GAATTGGAGTTCATTGCTGACACCTTCTCTGTCAAACTTGCGTCCGGTGATGAGAACTACTGAAGGA
CTGTAGTATGTGGAACTCTTCAATTTGCATGTAACCACCATCTTGGATCTACCCGACCGCTTGAACA
AGGAGTACAGGATTTCTGGCCAGTTCCTTGAAAAAGTTATGCGCAAGTATATTATCCAGTCGACCAAC
AAGGACGTGTTGATGCAAAAGTGGCAGCCCCCGGAGAAGCTTGTGCAACCTGTGCTTCTCTCCCCGAG
CACCACCATATTTCATGGCCAAAGGCTGCAGCTGTGCTCGGCATTGGTTCTGACAACCTTCGCAATG
TCCCAGTTGACATGCAAGCGCGCATGGACATAAACGAGCTCGACCGTATGTTGCAAAGGTGCCTGGAT
GAGAAGACGCCGGTATACCAGGTGCTTGTGTTATTGGCACGACCGAAGAAGTGGTATCGATCGCAT
TACAGAGGTCCTGAGACTACGCAAAAAGTATCAAGCCTTGGGTCTATCTTTCGCCATCCATGCAGACG
CAGCGTGGGGCGGATACCTTTGCAACCATGCTACCTAGACCCACACCATAACACCTGGACAAAATACA
TCGCTTCCCGCAGACAGCACCAATCCGGACTTTGTCCCATACGTGCGTTTTCGCCCCAGAGAGCGCCTT
ACAACCTCAGCCATATAAAGTTTGCTGACTCCATTACTGTGACCCGCACAAGGCAGGTTATATTCCGT
ATCCTGCCGGAGCGCTCTGCTATCGAGATGGTAGAATGAGACACCTTCTTACGTGGTCCGCACCCTAC
CTTATCCAAGGCAACGAAGGCCAAAGTATCGGAATATACGGGATCGAGGGAAGTAAGCCTGGTGCAGC
AGCATCCGCTGTATTTATGGCGCATGGAACCATTTGGCATTAAACGGTTATGGGAGCCTTCTTGGCCAGG
CAATGTTTACATGCCGCCGATACGCTGCTCACTGGTCTGCAATGTCTACCGATTCTACCACTTCACT
GTCACCCCGTTCAATCCTATCCCCGCTGACGTGACCCCAACGCTGACCCTGCAAAGGTTGAAGAGCA
AAAGCAGTTCATCAGAGATCGTATCTTGTTCAAGTCGAACGAGGAAATATACAACGATTCCGAGGCTA
TGAACTCTTGCAACCACTTGGGTCCGATCTCAACATCAACGTTTTTCGATGCAACTTCCGCGACCGC
GATGGCAATCTCAATATAGATGTGAGGAAGCCAACTGGCTCAATAACCGTATTTTCCAACGCTTCTC
TGTTACCAGTGCTGAGGAGAACCCATTGGATACGCCGTTCTTCTCAGCTCGACCACCTTGAAACAGT
CCGAATACGGCGTCTGCGCAGCCGAAGTAAAGCGACGCATGGGACTTGTAGGCGACCAGGATGTTATA
GTCCTTAGGAATGTTGTTATGTCTCCATTACCGGCAACGAACGACTTTGTGGGTACTCTGGCAAACAC
CTTCCAAAAGATCGTTGAGGAGGAGTTCGAGTATGCACGGATCCGCAACGATATGAAACCTAGCATTC
ACACCTTCCTTCTTACGGTTCAGTAGAGCAATATTATCTTGTCCACACCCCGACGATCCATATGGCT
AGCGGACGTGCCCAAATCATCCTTTCAGTAGATATTACGGGTACGGTTCACCAGGCGATACATGCCGA
TGAACAAGTTGAGGCGCTCATTATACACAACACTGTTCTCTCCGCCTTGACGATATTGTGGATGGAG
CGTCATTTCGAAGGCATACTTAGCATCGGAAAGAGGCAAACCTGATATCAAAGTTAACATTTCGAACATC
AAAGTCGTCAAGAAGCGCTCTCTGATGACTGAGGACCTGGAATCTGCGTACCCATCATTGATGCCATT
CTATTTCTACGGGACTCAAAAACACGCTCATATCGATCATGTCAATTAAGTGTCTGCTTCTAACATCCATC
TCAGTGCTGGCCGAATTGAATACAAATTCGACGACGACTTGTCAAGCGAGGACCTCGCCAAGGGTCTC
ATTGTCGTTGCTGAGAATGTACACGAGGCATCCATGCAGCCCTTCCCGCTCATGAAAGATCTCCATAT
CGACGACCAATTCTTCTTCAACTCTGGGCAAACTCTCCACGTCAAAGTATACAGAGACCCATACCCCG
CGTCGACCATGGATCCCATCCCTCTCCACGACATCAAGAACCAGCCCGTTGTTACACAAGGCACTATC
ACGCTCGTCGGAATCTTTACGTTGACTCTGATGCTCTCAATGTGCTTCCGAGCCTACTGCCGACGA
TGACGCTCGCGCCGCTTCTCAAGCTCGCAATATGTACGGCGAGATGACCGCTGGAACCATCAAAGGTT
GGCAAAGTGCTGTTCTGTGATTTCCACAACAAATTGGAGACTATCGCTCCCGCCAAGTAG

Glucosaminkinase codierende Sequenz

ATGTGCTCTATCTCTGTGTAGATTGTGGCGGATCAAAGACAGCAGTCGTTATCTGCAATCCAGTTGG
CACTATCGTTGGTAGAGCTACCGGTGGTCCATCCAACATCGCATATCTTACCCCTCAGTCTTTCAACA
AGACCGTGAAAGCCGCTGTCAATTGCCGCTCTTCAAATCGCCCTTCCCGATTCTCCAGACGTCTCCCTC

CCCGTTGTTGGAAAAAGTCCTTTCCATGCAGCCTGGTTTGGTGTCTCCGGAGCAGACTCGCCAGCAGC
TATCGCTCGCATCGCCGCCCTCTTTCAGAACTGCTTGGCTTGCCTCTGGGCCCCAAGTTGGTTATCG
CAAACGACACCCATCTGTTGGCTGCCCAATTTCGCATGTACTCCGATGTCAACCACGCAGTTGCTGTC
ATCGCAGGTACAGGATCCATCACCGTTAGCTTCACAGAAGTCGACGGCAAGATCGAAGAGCTCGGTGCG
CGTCGGGGGCTGGGGTTGGATTCTGGGGGACGAAGGCGGTGGATACGATGTGGGCCGTGAAGCATTGC
GACAGATTCTATTGGCGAATGACAAGTCATCCATTACGGGCGTTCGTTACCCAAAAGCATGCTCATA
GATCGCGTTTTGGAGATATTCTGGTGCAGCCACGGTATTGGAGATATTGACAGGGGTCTATCTACCCGA
TCCCCCGCCGGGTGAGACCAATCCAACCTGGTGAAACAAATGAACACCTCGAACGAGAGAAAACGTATAT
CGACCTGTCTCCTATTGTCTTCGAGGCCGCTTCAAGCACCATGACCCCTTGCTATGGACGTCGTG
AAGGCCACAGCCAGTCATTTAGTAGCTCAGATCGCTTGTCTCTCGGAGACGGTGTTGAATCATCTGC
TCGTACTGTTAAAGCATCTGAGAGTGTAATATCATTTGGCGGCTCTTTGGTTGGAGTCGAGGCTTATA
GGCAATTGATTCTCACCGACCTTGCTCAACGGGGTCATGTTTTCAAGCGATCCATTGTTATAGACGAT
GCTGCAGCTATTGGCGGAACTGCGTTGGCAGCTGCATTTACAGATTAA

Adenosinkinase codierende Sequenz

ATGTCTGCGCCCTCGTACTCCCTGTTCTGCATGGGCAACCCGCTGCTCGACATGCAGGTCCGCAACGG
CGAACAGCTCCTCGAGAAATACGGGCTCAAAGCCAACGATGCGATTTTGGCAGACGAGAAACAGTCCG
AGATATACGATGAATTGGTGAAGGAACATCAAGTGACATATGTCGCTGGCGGCGCGGCGCAGAACGCC
GCCCCGCGAGCAGCTTACATCCTCCCTCCGGGATCTGTTGTGTACACTGGTGCCGTGCGGCGACGATGA
GCTCGCGGAGCAGCTCAAGGCCGCTAACAAGCGCGAGGGCCTCGACCAGGTGTACCAGGTCAAGAAGG
GCGAGAAGACAGGCGCGTGC GCGGTTCGTTATCACCGGCCACCACCGATCCCTCGTCACCACCCTGCGC
GTCGCTGAGAAATTGAAAAGTCGCACTTGTGCTCGCCTGAAGTTGCGCCTCTTGTGAGAACGCCAA
GTTCTTCTACATCGAGGGATACTTCCTCACACACGGCGTCGAGTCCGCTCTCGAGCTGAGCAGCAAAG
CCTCCGCCGCGAGGCAAGACATTCTGTCATGAACCTCTCCGCGCCATTTCATCGCCCAATTCTTCGGGGAG
CAGCTTAACCAAATCCTGCCGCACACAGACATCATAATCGGCAACGAAGCCGAAGCCGAAGCATGGGC
AACC GCGCACAAC TACGATCCACGACAGACCTCGCATCCATCGCCAAGCAAATTGCGCTGCTCCCCA
AATCGAACCCCGCGCGCCCGCGCGTCTGTCGTCGTCCTTACCCACGGCGCGCAGAGCACGGTGCTGGTG
AGCGCGGACAGGCCGGATGAGGCGAGGGTGTTTGC GGTGGATGTGCTGGCGGATGATAAGATTGTGGA
TACGAATGGCGCGGGGGATGCGTTTGC GGGTGGGTTTCGTTGGTGCGCTTGTGGCGGGCAAGGACCTTG
AGGGTGCGGTGTTGGCTGGCCATGCGCTTGC GCGCCAGTGCGTGCAGCAGGTTGGACCACAGTACCCC
TGGCCAAAAGTCGACATCTTG TAG

MurG/FolC codierende Sequenz

ATGTCCATCGATTTATCGCTCGACCGCCTCAAATCTCTCTTACCATTCTCTCCCATACACCCGCCAAC
GCTGCACATCGCTGGCACCAATGGCAAAGGCAGTGTCTCCGCCCTGCTCACATCTATTCTCTCACAT
CTTCTCTCCCGCTCCGTATCGGGCGATTCAACAGCCCCCATCTCGTCTCTGTACTCGACAGTATCACC
ATAGATGATGTTGCTATCGATATCAAGGTCTACACAGAGACACGGACGGACGTGAGGGCGCACGACCG
CGAACAGGGCACCCGACTGACTTCCTTCGAGCTCCTTGCGATGACAGCGCTGCGCATTTTTGAAACTG
CCCACGTCGATGTGGTCGTTCTGGAAGTCGGCATGGGCGGGCTCCGTGATGCGACAAACATCGTGCCT
ACTGCGTGATTTCTGTCGTCGGCCCTCGCCGCGGTGATCTTGACCACCAGGCATTTTTGGGCGATAC
AGTTGCACTCATTGCTCGCGAGAAGGCTGGAATTGCACGTAATGGGAGACCATTTATCTTGGGACGGC
AGCAGCATGGAGAGGTCCAAGGCGTTGTGGAAGAGGTGCTGCGTGAGGCTGGGGGGACGTTGCTGAGA
AGCGTTGACGTGTCAACCGTCGATTACAGGTACATGGTCGCCGTTTAACGATGCCTCAAAGACAGGGCC
GCCACCACGCATTGTCAAATTTCAATTACAAGCTTTCCCTGAGGCAATCGAAGCCCAGTTCCCACTTC
AAGGCGCGCACCAGCTCGACAACCTAGGCACTGCGCTTGGTGTCATCGATGCTCTCCTCACATTTAAC
TACCCCGATACAGATCTGCTTAGGCTCCGAGAACGCATCACACCAGCGTCCATATCTGCAGGTATCGC
AAAAGTCAAATGGCGCGGTGACTCTCGTTCCACTCTATCTCTGTCCAGGGCCTTCACCTCTCGACC
TCCTCGTGCTCGCAGACGGCGCACACAACCCCGCATCAGCCAAAACCTCTGGGTGAATACATTACCTCT
CTCCTCGAAAATACCACTACAACCTCCAATCCACATAACATACATCCTCAGTCTCTCTCATTGCGCTCC
CAAAACACCTCTGCAAACGCTCTCGCCCATCTTGCCACCGTTTCTGAGGACATCAAGTTTGTAGTCCAC
ATATATCTGTTGCGCTGCTCCCGTTCTCCCGCCGGAAGGCATGCCATGGGTCAAACCTGTAGCCCTC
TCGACGATGCGTGAGACTGTGCAGGCGCTTGTTCAGAGCTGGGCGAGGGTGATGTGTGGTTGTATC

GGAAAAATGAAGGGTTGAAGCGCGCGCTAGAAATGGGCAGCTGAGAAACAAGCAAAGCGCGGTGGAGAGG
GATTGGTGGTGCTCGCTGGCAGTTTGTACCTCGTCGCAGATTTTACAGATTGTTGGAACACGGCTCT
TCACTGTGA

ThiD codierende Sequenz

ATGAGCAACGTTGTTTTGACCATTGCAGGCTCTGACTCTAGTGCTGGAGCTGGTATACAGGCCGACCT
GAAGGCTTTTCGCTGCTCATGGCTGCTACGGAACGAGTGTAATTACCGCCTTGACCGCTCAAAACACCA
AAGGAGTACAGGGTGTTTCATGCAACTCCACCCGGATTTCGTAGCGCAGCAAATAACATCCATATTCGAC
GACTTGGATGTTTCGTGCTATCAAGACTGGAATGCTTTTCGATGCAGCAATCGCGACAGTGGTTGCTCA
ATGCCTCAAAACGCATGTAGCACAGGGTGCCTGCCCCCTGTCATTTGCGATCCAGTTTGCGTTTTCGA
CCTCAGGCCATACGCTGTTACATGAAGATGCCCTTCAAGTCCTCATTTTCAGAGCTCTTCCCTCTTGCT
ACTCTTATCACCCCTAACAAACCTGAAGCTGAGCTTCTCCTATCAAAAATGGGTGTGCCGGATGTTGA
AATCAACAACCTGGATGACATGTTGTCATCCGCGAAGAACTGTTATCGGTCCGATGTGAAGCTGTAC
TTCTCAAAGGAGGGCATGTCAATTACCAGCATTGACGAAGTCGTTTTGGCTCAGGAAAAATACTCCGGT
TTAAAGGTCATTAAACAGGGCATGCTAGGAGACAACATGGAGATTATTCTGGTCAACTACCCAGAAAT
CGCGATTGAGAACTTGGAACTGGTCGCAGATGTGCTCTGTCAAAAATCTGGCTCAACGACAATCTTTG
TACGCCACACATCAAATCCTCGAGTACACATGGTACAGGATGTACTTTGAGCTCTGCCATTGCCGCG
GAACTCGCCAATGGATCTCCTTTGGAAGATGCAGTTGCGAATGCTGCGTTGTACACACATCTCGGAAT
TCAAGCTGCGGATCCGATCGGCAGTGGACATGGGCCTCTAAATCACTTTCACAACGTCACGAAAATTT
TGATTCCACAGCGCACGGAGACAAATCCGTACCCTTTCACTCGACTCCTCATTTGAAGGTGCCCTCATCC
AGTTGGAAAGATTATGTCGAGCACGCCTTCGTCAAGCAACTTGGAGAAGGGACTCTCGATCGAGCTCG
ATTTATTCATTTTCATCAAAACAGGACTACCTGTACCTCAAATACTATGCACGGGCATATGGGCTCCTTG
CCGCGAAATCAACATCCTTCGGGTGGATACGAAGCGCAACAGAGACGATCCTCAACGTCTTTCACGAG
ATTGGAACACAAAACGTACTGCTCCACTTTTGGCATTACAGAGGCTGAACTAGAGAGCACACCTGA
GTCGGCAGCTACAACTTCTACGGTGCCTATATCATGGATGTTGGCTTGCAAGGAGATTCTATGAAAT
TGGTGATGGCGTTGACAGCATGCTTACTCGGATATGGGGAGGTGGGCCTTTGGTTGAAAAACAAGCC
AGCACAAAAAACAGCTGGGTTATGCTAGAGGGAAATCCGTACAAACATTGGATCCAAGAATACTCCGG
ATCGATGTACCAGGACGCCGTTAGAATTGGTTTAGAAACAATAGAATCGTACGCCGTAGCCGACCCGC
CATCCGCACAAAGGCTGAAAGAGTGGCAGACCGTTTGGGAGAGATGTACGAGGTTGGAGAAAGGGTTC
TGGGACATGGCGATGCAGTTGAGCGAGTAA

glu1

ATGCATCCGATGGGTTTTCTGTGTCAGAGAAATCCATCCGGCGCGGCCCAACAAACGACAGTATTAATGA
CCTTATAATTACTGGCATCATTACTCTAGGTTCTATCGTTCTGCTCTACTGGTGGCACTTGGACTTCC
ACGACCTCCGACCGTCAGGCAACCGGAACCGTATTTATCCACGAGGCACCAGGGATCCGGCGTACCTT
ATTAAGGCGTATAATGGTGCTGTGCTGCAGAGAACGAGCTATGCTCTAAGATGGGCGTTGGCGTACT
CAAACAGGGAGGGAATGCAGTCGACGCCGCTATCAGTGCCACGCTTTGCACAGGCGTTGTGAACATGT
TCTCTTCTGGAATCGGTGGAGGAGGATTATGATCGTTTCGATTACCTCCCGAGTCACCGGGGGAACCT
TCGGAAGTATGGTCAATCAATTTCCGGGAGACAGCACCTGCATTGTCAAATCAGACAATGTATGAAAA
CAACCCGTTGGGGTCCCGATACGGAGGGCTGGCTGTGGGAGTGCCTGGAGAGATTTCGCGGGCTGCAGG
AGGCGCATCGCAGGTGGGGCACCATCCCATGGAAGGACCTAGTAGAGCCGGCCGCAAAGCTTGCTGCA
CGGTGGCGCGTCCAAAAGGAATTAGCAAGGCGTATTCAAATGTACTCGTCCCTCATGCTAGATAGTCC
GGACTGGAGTGCCATATTTGCACCACAAGGAATGTTACTGAAAGAGGGAGATAGGATATCTCGGGCAA
ATTACTCGCGAACATTGTCCATTATTGCAGAGCAAGGTCTTGACGCTTTCTATGATGGACCAATCGCT
GATGCACTTGTGCAAAAGGTCCGTCAGACAGGTGGAATATTGACCACGGAAGACCTGAAGCAATACCG
TGTTTCGAGTGGATAAGGCGTTTTTCATGGAACCTTACCGCGGTAGACATGTGTATACCAATCATGCACCAG
GAGCTGGTCTCTCTTACTGCAGATGCTCCATGTTCTTGAGAACTACGATCTAACAGAAAGAACACCA
CTTAACGTTTCATCGAGTCGTTGAAACTCTGAAGTTTCGCTTTTGCCTCTCGGACGCGAATGTCCGATCC
GGCGTCTCACAATGATACCAACGTATGGAGATCATGATGACGAAGGAATACGCACACGAAATATATA
CCAATATAACTGACGACAAGACTCATCCCCCGGAATACTACAACCCCGAGTATGGTATGAAGCCTGAT
CATGGAACCAAGTCACACGTCCATAATCGATCGAAATGGAATGGCTGTTTCACTAACGACGACAGTCAA
TAGCGTTTTTTGGCTGCCATGTCTTGATCCTACCACTGGTATGGTGCTGAACGATGAGATGGACGATT
TTTCTGTGCCTGACACACCTAATGATTTCCGGTTATGGCCTTCTCCATATAATTTTCCCTGCCGGGA

AAGAGGCCCCGTGTCATCCACTGCCCCTACTATCATTGAAAATGCTGATGGTTCGATTTATGCCTCTAT
 TGGTGGTGCCGGCGGAGCACGAATTTTCGGTTCATACTTCAGGTTCTTCTCAATCTTGACTGGGGCC
 TTGATGCCAGTGAAGCGGTTGAATTCAGTCGTCTGCACGACCAATTGTATCCGCTGGTTCGGATGCA
 GATGAAGATTATCCCTCGGAGTCGCTGGAATTCCTGCGACGGTTGGGTCACAATGTCACTGTTGCTGA
 CATCAATAGGATAGCGGCAGTTGTTCAACTTGTGGTCAAGAGAGATGGTGTCAATTTACGCCGCGAGCG
 ATTCCAGAAAGAATGGGATTGCGGCGGGCTATTAG

Glu1

MHPMGFLSEKSIRRRPTNDSINDLIITGIIITLGSIVLLYWHLDFHDLRPSGNRNRIYPRGTRDPAYL
 IKAYNGAVAAENELCSKMGVGVLKQGGNAVDAAISATLCTGVVNMFSGIGGGGFMIVRLPPESPGE
 SEVWSINFRETAPALSNQTMYYENNPLGSRYGGLAVGVPEIRGLQEAHRRWGTIPWKDLVEPAAKLAA
 RWRVQKELARRIQMYSSMLDSDWSAIFAPQGMILLKEGDRISRANYSRTLIIAEQGPDAFYDGP
 DALVEKVRQTGGIILTTEDLKQYRVRVDKAFHGTYRGRHVYTNHAPGAGPLLLQMLHVLNENYDLTERTP
 LNVHRVVETLKFASFASRTRMSDPASHNDTQRMETMMTKEYAHEIYTNITDDKTHPPEYYNPEYGMKPD
 HGTSHTSIIIDRNGMAVSLTTTVNSVFGCHVLDPTTGMVLNDEMDDFSVPDTPNDFGLWPSFYNFPLPG
 KRPVSSAPTIIENADGSIYASIGGAGGARIFGSILOVLLNLDWGLDASEAVEFSRLHDQLYPLVLDA
 DEDYPSESLEFLRRLGHNVTVADINRIAADVQLVVKRDGVIYAASDSRKNIGIAAGY

glu2

ATGACATCGAAGATAAAAATTGACTGGGACAAAGTCAATCATCCCGATCTTACGTTCCAGCAATTCCC
 AAGTCGAAGGTCTGTGGTATATGGAACGAAAGGTGTTGTGGCTTGCTCCCAACCTTTGGCTGCCGAAG
 CTGGTTTGGAAATCCTGAGGAAAGGGGGGAATGCAGCGGATGCCGCTGTTGCAACCTCGGCTGCGCTG
 AATGTGACTGAACCCAGTTGTTGTGGCATCGGAGGCGACGCATTCTGTTTGTCTATGATGCCAAAAC
 CAAGCAGGTCAAGGCTTTCAATGGCTCTGGCAGATCGCCCAAGAAGCTGGATATAGATCACACCCGGA
 AGCGCGGAATTGAAGGAAGGCGAATTCCTCTGACCGACTTAAATTCAGTAACCGTTCCTGGTGCAGCC
 GCCGCTTGGGCCGACACTGTCAAGGAGTTAGGAAGCGGAAAGCTTACTCTTCTGAAGTTCTTGATCC
 CGCGATCCGTCTTGCCGAGGAAGGGGTCCCTGTTTCCGAAATCAATGCTTCGGCTTGGAAGAAATCGG
 AGGACTTGATCAAGAATGCTTCGCCCCAAGCTGGCGAAATGTTGCTCAACGGCCGCGCGCCTCGAGCT
 GGAGAAATCATCAAACTTCCAAATCTCGCTCGGACGTTTAGGGAATTGGGAGAGAAGGGAAAGGATGG
 TTTCTACAAGGGCCGAGTAGCCCAAGCTATCGTTGATCTGATTCAAAGCCAAGGAGGAGTTATGGAAC
 TCGAAGATTTAGTTGAACATTTCGACGGCTTTTGTGGAACCTATCAGCTATACTTATGCCAATGAGGTC
 ACTGTCTATGAGTGTCCACCGAATGGTCAAGGCATCACTGCTCTCATTGCCCTCGGCGTCCTCGAGCA
 GATGCAGGAACAGGGTTTGGCCAAAACCTGCTCGAAATGGAGCATAATTGCGCCAGAATATCTTCACG
 CTCTCATTGAAGCGCTCAGACTTGCCTTCGCGGATAGTCAATGGTACGTGCGAGATCCTGACGTGGTT
 CACGTTCCCGTCAAGGAACTCCTGAGCAAGGAATATCTTGCGAAACGAGCCAAACTCTTCAATCCGGA
 GAAGACGAATCCCCAAGTAGTTTATGGAACCCAGTGAACAGTTCCGATACGGTCTACTTCACTGTTA
 GCGATCAGTGGGGAAATGCATGCAGTTACATACAAAGCAATTTTCGAGGATTTGGTACCGGTGCAATT
 CCTAAGGGGTGTGGGTTCACTCTGCAGAACCGTGGAAATGGCTTCATTTTGGATGAAAACCATCCAAA
 CGCCCTACGAGGTGGGAAACGTCCGTACCATACTATTATCCCTGCCATGGCCCTTCGAGGAGACGAAT
 TGTTCTTGAGCTATGGTGTATGGGTGGTTTTCATGCAGCCACAAGGCCATGTGCAGGTTCTCTTGAAC
 GTGCTACGAGGATTACAGTCCAAGCGGCCTTAGATGCCCCCAGATTTTGTATATCCGCAGGTATGCC
 TGAAAACCAGAAAACGTGAGGCGGAGCGGCGGGGGATGCCAACAGTGAAGTTTATTTTGAAGACACAT
 TCCCCGAAAGAAACGATTGACAAATTGATGGAAATGGGCCATGATGCTCGTGTGCTATCCGGGTTTCAG
 CGAGGACAAGTAGGACGAGGTGAGATCATTCAAAAATTACAGGATGGCACTGGTAGACTCGTGTGGGC
 GGCTGGGTCTGATCTTCGTGCAGATGGACACGCAGCTGCGCAGATATAG

Glu2

MTSKI KIDWDKVNHPDLTFQQFPSRRSVVYGTKGVVACSQPLAAEAGLEILRKGGNAADAAVATSAAL
 NVTEPSCCGIGGDAFLFYDAKTKQVKAFNGSGRSPKKLDIDHTRKRGIEGRRIPLTDLNSVTVPGAA
 AAWADTVKELGSGKLTLEVLDPAILRLAEEGVVSEINASAWKKSEDLIKNASPNAGEMLLNNGRAPRA
 GEIIKLPNLARTFRELGEKKGDFYKGRVAQAIVDLIQSQGGVMELEDLVEHSTAFVEPISYTYANEV
 TVYECPPNGQGITALIALGVLEQMQEQLAKNLLMEHNSPEYLHALIEALRLAFADSQWYVADPDVV
 HVPVKELLSKEYLAKRAKLFNPEKTNPQVVHGNPNVSSDVTYFTVSDQWGNACSYIQSNFAGFGTGAI

PKGCGFTLQNRNGFILDENHPNALRGGKRPYHTIIIPAMALRGDELFLSYGVMGGFMQPQGHVQVLLN
VLRGFTVQAALDAPRFCISAGMPENQKTSGGAAGDANSEVYFEDTFPKETIDKLMEMGHDARVVSQFQ
RGQVGRGQIIQKLQDGTGRLVWAAGSDLRADGHAAQI

phos1 / phy1

ATGCACAGTCTCGGTCTGTTTCGCTTTAATCAGCTTGTTCGCCCTACCTCGTCGTTGCGCAACGTGCATC
GACCTTTGCAGGCGCGACTACAACCGCTGTGTTCCCCCACCCAATGCTGGTATTGCAGCAACCGACA
CGAACTTCCCCGATGGCTCTAAAGTTGGATTCCAGGTCCAACGCGCACCGGAGACGAAGCAGCAGCA
ATAGAGACTGCACCCGTGGCTGCCAAAGTCGACAGCTTCTTCCCCCTGATCAATGGGGGTGCTGAAGA
TAGCACACCGATGGACCCCTTCGACGTCTTGGTGCACCTCGGAAATTTGAGCCCTTTCCAATCCGTCC
CATCATCGGCGTTTGGTCTGCCTGGAGCATCTCCCTCATTCCTGAGGGATGCGACATCGTACAGGCC
CACCTTCTTACC GCCATGGTGC GCTTACCCCACTGCTGACAGTGGTCCCCCAGGATTTGCAGCCAA
GGTCAATGCCGCTGCTAATTCGGGATCTGGGTCTCGGCGAAAGGCGATCTCAGTTTCTTGAACACTT
GGACTTACAACTCGGTGGTGCATTTTTCGACACCTTTTGGTGCCTCACAACCTTTCAACTTGGGTGTT
GGGTTCGGTGTCAAATATGGCCAATTGCTGAAAGGATTCAAGAATCTACCCGTCTTCCGAACAACCTC
CGAAGCGCGTATGCTTGACTCCGCTCTTCATTTTCGCTACGGGTTTCTTCCGTGTACAAAAGTACCAAG
ATAGTTATCACCAACTTATCACGATTGAGCACGGGGGAAAGCAGAACACACCCTTGCCCCGTACGAG
TCATGCACTAACGGACTGAATGCCGTCGCCGCGTTTCGGTGCATTCAAAGCCAGAAATGGGCCAGAT
ATACTTGGCCCCCTGCAGTAAAGAGACTCAACGCAAACCTCAGGGGACTGCAACTCAACGTGACGGACT
TGTTTGCTATGCAACAACCTCTGCGCTTTTCGAGACCGTCGCCCTTGGATATTCCTCTTTCTGCGACCTG
TTCACTGAGGAGGAATGGAGAGGATTCGAATATCAAAGCGATCTTCAATTCTGGTACTCTTTTCGGACC
CGGTAACCCCGCATCCAGCGCCATGGGTATCGGCTACGTCCAGGAACCTCGTTTTCACGACTCACCAAGA
CGCGCATCACGACCTTCGACACCACAGTCAACGCCTCGATTGTGACGAGCGATATTCTCTTCCCACTA
GACCAACCCATCTACGTTGACGCAACCCACGACACGATTTTTCGCGTATTTTCGCTGCCATGAACCT
TACGACTCTTGCTGCCAACGGACCTCTGCCCACCGACCACATTCCAAAGGCCAGACATTCTTCGCCA
ACCAACTCGCACCCCTTCGAGCCAACGTGCTCGGCCAAGTCTCTCTGCCCAGCCTCTTCCAAGCCC
ACACACATCCGCTGGATAATCAACGACGGCGTCTCCCGCTCACAGGCATCAAAGGGTGCAGCCCGA
CAAAAACGGCATGTGCGAGATCAACACGTTTCATCGCGGGCATGAAGCAGCGCATGCAGGAGATCGACT
TCAACTTTGACTGTTTCGCGAACTACACCGTGCCTGTTCTCTGATAACATTGTCAATGGGCAGTACCCG
CAGAACTTGAAGCCTAAGAAGAAGTAG

Phos1

MHSLGLFALISLLPYLVVAQRASTFAGATTTAVFPPPNAGIAATDTNFPDGSKVGFPGPTRTGDEAAA
IETAPVAAKVDSFFFLINGGAEDSTPMDPFVDVLVHLGNLSPFQSVPSAFLPGASPLIPEGCDIVQA
HLLHRHGARYPTADSGPPGFAAKVNAAANS GSGFSAKGDLSFLNTWTKLGGDILTPFGRSOLFNLGV
GFRVKYGQLLKGFKNLPVFRRTTSEARMLDSALHFATGFFGVQKYQDSYHQLITIEHGGKQNNTLAPYE
SCTNGLNAVAAFGDIQSQKWAQIYLAPAVKRLNANLRGLQLNVTDLFAMQQLCAFETVALGYSSFCDL
FTEEEWRGFQSDLQFWYSFGPGNPASSAMGIGYVQELVSRLTKTRITTFDITTVNASIVTSDILFPL
DQPIYVDATHDTILTIFAAMNLTTLAANGPLPTDHIIPKGQTFANQLAPFAANVVGQVLSCPASSKP
THIRWIINDGVVPLTGIKGCKPDKNMCEINTFIAGMKQRMQEIDFNFD CFANYTVPVPDNI VNGQYP
QNLKPKKK

phos2 / phy2

ATGACCAACAGACCCGACATTGAAGCGGGTGCCGCTGGGCAAATGCCCAACGACTATGATGCCAATGA
TACCGAGACAGAGTCTCTCCTTCCAACCACACGGCCTGAAGAAGATGTGTTGTTGCATTACCGAAGA
AGTCAAGGTCCACCTTCCACGATAAAGCCTGTGGACAACCAAGTTTCGGAGTTTTGCATATAACTGGG
GCGTTTGTGCTGGGCACCTATTGCGACACTGGCTGCGCAGTACGCCATTTGCGGGTCCAGCTGTTTTCAC
AGGAGGACAGCAAGGTTTCGCGTTTCGGCTTCTGCGTATTTCGCATCAGAACCAGGAAGTTGTCACCGCGC
TAGCACCGCCGTGGGTTCGGATCCACTGAGTCGCACCAGTTCCCCCTCCAATCCAACGAACGCGTTC

CCTTCGTTGTTCCCTTCTGATGTAGGCTATGCCGGCCCCAACACCCACGGGAGCAGAGGCTGGAGTTAT
CGCGACAGCTCCTGCATACCCAATGCATACGGGTCTAGTCTCGCATGAGCTCCTGAAGCCCGCTCGC
TGTACGGAGAGGCGAAGAAGGATCCGGAACATAACGAAGCGAAGGGAAAGAAATCCAAATTCAACTTG
TTCCGTAGCTGGGGCAATCTTTCCCCGTGGTATAGCGTTGACAGAGGCCGTTTGGCGTGGATTCTAG
CCCTGATGTTCCAGAGACATGTCTGGGTTACAGGGTTGCATTTCTTGCATAGACACGGCGCCAGGTATC
CTACAGCGTGGGCAAGCTTCGGTGGTCTGCCAAGTTGGGAAGGAACTTCATAGATCTCCAGAATCC
TGGAATGCGTCTGGAGATCTCGAATTTTTGAATGGATGGACCTATAAACTTGGAGAAGAGATCTTGAC
ACCATTTGGAAGGCAGCAACTTTATGATCTTGGAATCTCACTACGAATCAAATATGGGTTCTGCTGC
AGAACTTCACTGAGAAGAACACGCTTTCCTGTGTTTCAAGACTGAATCTCAAGATCGCATGCTTGCTTCT
GCCCCAAACTTTGCAGTTGGGTTCTTTGGTTACCTCTTGATGGTCAATACCAGCAGAGTATTACAAT
CGAAGAGGACGGGTTCAACAACACGCTATCTCCTTACAAGACGTGTCCTAATGCCAAAATTATCCACA
AGTCGGAGCGAGGACAATGGTACATCAAGCGCTGGGCAAATATCTACCTCAAAGAAGCCCCAAAAGCGA
TTGCAAAAACAGTTGCATGGCATTGATCTGACAATTGAAGAGACATACATGATGCAACAGCTTTGTCC
ATACGAGACTGTGGCCCTTGGATACTCCAAGTTCTGTGAGCTGTTACCGAAGAAGAGTGGGAGGGAT
TCAACTATGCACTCGATTTGCAATCTGGTATGGGTCTGCGTTTGGTTACCCGTCGCTCGCGTGCAG
GGCATTGGTTACGTCCAGGAAATGGTTGCTCGTCTAACCAACACACCCATCCAAACGCACAACCTCTTC
CACTAACGCCACATTAAATGACAACCCCATTAATTCCTCTTGCCAGAGTCTGTATGTCGATGCCA
CCCACGAAGTTGTCTGTTTTAAACATCATTACTGCCCTCAACTTAACCTTCGTTCCGCCGATCAGGACCT
CTTCCTTATACACATATGGACCCCAATCGTACATTTAGGGTCTCCGAACCTCGTCCGTTCCGCCAGAA
TGTCCAATTCCAACCTTCTGGAATGTACGTGACCCCAAGGCAACAGATCAGGGTGATCATCAACGACG
GCGTCTGTCACACTCACAGGCATCCGCGGATGTCCCGAGCAGAAGGACGGCATGTGCCAGTGGACACC
TTCGTGCGAGCACAGAAGGAGATCATCAAGGAGTCTGACTGGCTATATGACTGTCTATGGCGATTGGAC
GGTCCCGGAAGGTACTGAGTGGGAGACTGTTATCGGCTCGCCGCCGAAGCGAGCTTAA

Phos2

MTNRPDIEAGAAGQMPNDYDANDTETESLLPTTRPEEDVLLHSPKKSRSSTFHDKACGQPRFGVLHITG
AFVLGTIATLAAQYAICGSSCFTGGQQGSRSASAYSHQNQEVVTALAPPWVGSTESHQFPPNPNTNAF
PSLFPSDVGYAGPTPTGAAGVIATAPAYPMHTGQCSHELLKPASLYGEAKKDPEHNEAKGKSKFNL
FRSWGNLSPWYSVDRGRFGVDSSPDVPETCRVTGLHFLHRHGARYPTAWASFGGPAKLGRKLHRSPES
WNASGDLEFLNGWYKLGEEILTPFGRQQLYDLGISLRIKYGFLLQNFTEKNTLPVFRTESQDRMLAS
AQNFVGVFFGYPLDGQYQQSITIEEDGFNNTLSPYKTCPNAKIHKSERGQWYIKRWANIYLKEAQKR
LQKQLHGIDLTIETTYMMQQLCPYETVALGYSKFCELFTEEEWEGFNALDLQFWYGSFAFGSPVARVQ
GIGYVQEMVARLTNTPITQTHNSSTNATLNDNPITFPLGQSLYVDATHEVVVLNIITALNLTSFAGSGP
LPYTHMDPNRTFRVSELAPFATNVQFQLLECTSTPGQQIRVIINDGVVPLTGIRGCPEQKDGMCVPDT
FVAAQKEIIKEVDWLYDCHGDWTVPEGTEWETVIGSPPKRA

lac

ATGAATTTTCTTCTAAGCATCGCTACCCTTGGACTGGGACTTCAAGCCTATGCTGTCATGATAGGTCC
CTCCGCGACTTTGGTTATCGGAAACAAAACATAGCTCCCGACGGAATTAAGCGCTCGGCTGTTTTAG
CTGGAACCTTCACTGGACACTCTATCTTTCCCCGGACCTGTAATTCGGGCCACAAAGGGCGACACGCTG
AGCTTGAACGTCGTCAATCAGTTAACTGATGCCACTATGCTGATGGGCACGAGCATCCATTGGCATGG
TTTTTCATCAAAAAGGAAGTAGTTGGGCAGACGGTGTTGTGCGCGTGAAGTCAAGTCCCTATGCTCCTG
GTCATTCTTTCTATATCAGTTTCCACGGCCAACCAAGCTGGGACTTTTTGGTATCATTCTCATTAC
TCTACACAGTATTGCGATGGCCTTAGAGGAGCTTTGATTGTTTATGATCCAACCGATCCCTATAGAAC
CTGGTATGATATCGACGACGAAAGTACAATCATTACCCTTGCAGATTGGTATCATAAGGCTGCTCCTC
TACAGACCCTCCGAAGTCTAAGGAAGATTAGTTCTGATCAACGGGCAAGGTCGCGTTCCCGGAGAT
AAAATACTGATTCAACTCCCTTGTCTAGTCATAAACATAATTCCCCAAAAGCGATATCGGTTCCGTCT
CATTTCAATTTCTGTGATCCTGCATTTTCTTCTCGATTGATGGTCAATCTATGACCGTCATCGAAG

CTGACTCTCAGAGCGTGCAACCTCTTACTGTGAATGAAATTACTATCTTCGCCGGTCAACGATATTCT
 TTTATTCTTTATGCCAATAATCCGGTCGGAACTACTGGATTCCGGTCGCAGCCTACATAACCAGATGA
 TGGGATACAAGGCTATGCAGGAGGCATCAACTCTGCCATACTACGTTACTCTGGAGCCCCCGCAGTCA
 ATCCAACGACAAAAAAGGCTTCCATTACTATTCTTTGGTTGAAGCAGATCTACGGCCTCTCTATAGC
 CCGGCCGCCCCGGGCCTTCCATCTCCAGGAGCTGCCGACGTCAACATCAAGCTCGATATTTCTTACAA
 CTCACCTTCCGAGACGTTTTTCGTTAATAATTCCACCTTCCCAGAAGTCCCGGTTCCAGTGTGCTCC
 AGATACTCAGCGGAGCCCAGTCAGCAAATGATTTGCTCCCCGCCGGATCGGTTTATACTCTCCCCCT
 AATAAAGTCATAGAAATATCTATGCCCGGTGGAAGGCCCGGAAGCCCACACCCTATGCATTTGCATGG
 CCACGATTTCTCCGTCGTGCGAAGCGCCGGCAGCAATCGGTACAACCTATGCCAATCCTGTCAGGCGCG
 ACGTAGTGAACATAGGAATGGAAGATACGGACAACGTTACCATACTTTCAAGACCGACAATTCCGGC
 CCTTGATCCTGCACTGCCACATTGATTGGCATATTGAGGCTGGTTTGGCGGTGGTTTTTCACAGAGGA
 CATTCCATCCATTCAATTCAGCAATCCTCCTCTGCTTGGGATCAACTTTGTCCCATTTTCAACGCCA
 TACCTCCTCAAAAGTTCCATTAA

Lac

MNFLLSIATLGLGLQAYAVMIGPSATLVIGNKNIAPDGIKRSVLAGTSLDTLSFPGPVIRATKGDTL
 SLNVVNQLTDATEMLMGTSIHWHGFHQKGTSWADGVVGVTQCPAPGHSFLYQFPTANQAGTFWYHSHY
 STQYCDGLRGALIVYDPTDPYRTWYDIDDESTIITLADWYHKAAPLQTLRTAKEDSVLINGQGRVPGD
 KTTDSTPLSVINIIPQKRYRFRLLISISCDPAFSFSIDGHSMTVIEADSQSVQPLTVNEITIFAGQRY
 FILYANNPVGNYWIRSQPTYDDGIQGYAGGINSAILRYS GAPAVNPTTKKASITIPLEADLRPLYS
 PAAPGLPSPGAADVNIKLDISYNSPSETFFVNNSTFPEVPVPVLLQILSGAQSSANDLLPAGSVYTLPP
 NKVIEIISMPGGRPGSPHPMHLHGHDFFSVRSAGSNRYNANPVRD VVNIGMEDTDNVTIRFKTDNSG
 PWILHCHIDWHIEAGLAVVFTEIPSIQFSNPPPAWDQLCPINFNAIPQKFH

lacNA

ATGGTCATGATAGGTCCCTCCGCGACTTTGGTTATCGGAAACAAAAACATAGCTCCCGACGGAATTAA
 GCGCTCGGCTGTTTTAGCTGGAACCTTCACTGGACACTCTATCTTTCCCGGACCTGTAATTCGGGCCA
 CAAAGGGCGACACGCTGAGCTTGAACGTCGTCAATCAGTTAACTGATGCCACTATGCTGATGGGCACG
 AGCATCCATTGGCATGGTTTTTCATCAAAAAGGAAGTAGTTGGGCAGACGGTGTTGTTCGGCGTGACTCA
 GTGCCCTATTGCTCCTGGTCATTCTTTCTATATCAGTTTCCACGGCCAACCAAGCTGGGACTTTTT
 GGTATCATTCTCATTACTCTACACAGTATTGCGATGGCCTTAGAGGAGCTTTGATTGTTTATGATCCA
 ACCGATCCCTATAGAACCTGGTATGATATCGACGACGAAAGTACAATCATTACCCTTGAGATTGGTA
 TCATAAGGCTGCTCCTCTACAGACCCTCCGAAGTCTAAGGAAGATTGAGTTCTGATCAACGGGCAAG
 GTCGCGTTCCCGGAGATAAACTACTGATTCAACTCCCTTGTCAGTCATAAACATAATTCCCCAAAAG
 CGATATCGGTTCCGTCTCATTTCATTTTCGTGTGATCCTGCATTTTCTTTCTCGATTGATGGTCATT
 TATGACCGTCATCGAAGCTGACTCTCAGAGCGTGCAACCTCTTACTGTGAATGAAATTACTATCTTCG
 CCGGTCAACGATATTCTTTTATTCTTTATGCCAATAATCCGGTCGGAACTACTGGATTCCGGTCGCAG
 CCTACATAACCAGATGATGGGATACAAGGCTATGCAGGAGGCATCAACTCTGCCATACTACGTTACTC
 TGGAGCCCCCGCAGTCAATCCAACGACAAAAAAGGCTTCCATTACTATTCTTTGGTTGAAGCAGATC
 TACGGCCTCTCTATAGCCCGGCCCGCCCGGGCCTTCCATCTCCAGGAGCTGCCGACGTCAACATCAAG
 CTCGATATTTCTTACAACCTCACCTTCCGAGACGTTTTTCGTTAATAATTCCACCTTCCCAGAAGTCCC
 GGTTCCAGTGTTGCTCCAGATACTCAGCGGAGCCAGTCAGCAAATGATTTGCTCCCCGCCGGATCGG
 TTTATACTCTCCCCCTAATAAAGTCATAGAAATATCTATGCCCGGTGGAAGGCCCGGAAGCCCACAC
 CCTATGCATTTGCATGGCCACGATTTCTCCGTCGTGCGAAGCGCCGGCAGCAATCGGTACAACCTATGC
 CAATCCTGTGAGGCGCGACGTAGTGAACATAGGAATGGAAGATACGGACAACGTTACCATACGTTTCA
 AGACCGACAATTCCGGGCCCTTGATCCTGCACTGCCACATTGATTGGCATATTGAGGCTGGTTTGGCG
 GTGGTTTTACAGAGGACATTCCATCCATTCAATTCAGCAATCCTCCTCTGCTTGGGATCAACTTTG
 TCCCATTTTCAACGCCATACCTCCTCAAAAGTTCCATTAA

LacNA

MVMIGPSATLVIGNKNIAPDGIKRSAYLAGTSLDTLSFPGPVIRATKGDTLNVLNVNQLTDATMLMGT
 SIHWHGFHQKGTSWADGVVGVTQCPIAPGHSFLYQFPTANQAGTFWYHSHYSTQYCDGLRGALIVYDP
 TDPYRTWYDIDDESTIITLADWYHKAAPLQTLRTAKEDSVLINGQGRVPGDKTTDSTPLSVINIIPQK
 RYRFRLLISISCDPAFSFSIDGHSMTVIEADSQSVQPLTVNEITIFAGQRYSFILYANNPVGNYWIRSQ
 PTPYDDGIQGYAGGINSAILRYS GAPAVNPTTKASITIPLEADLRPLYSPAAPGLPSPGAADVNIK
 LDISYNPSETFFVNNSTFPEVPVPVLLQILSGAQSANDLLPAGSVYTLPPNKVIEISMPGGRPGSPH
 PMHLHGHDFFSVVRSAGSNRYNYANPVRD VVNIGMEDTDNVTIRFKTDNSGPWILHCHIDWHIEAGLA
 VVFTEDIPSIQFSNPPPAWDQLCPIFNAIPPQKFH

Alignments

Alignments von Phos1 mit Phos2 und weiteren Proteinsequenzen putativer Phosphatasen aus psilocybinproduzierenden Pilzen. Das Alignment wurden mittels Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) erstellt.

Phos2	MTNRPDIEAGAAGQMPNDYDANDTETESLLPTRPEEDVLLHSPKKSRSSTFHDKACGQPR	60
Phos1	-----	0
PcyA	-----	0
Pser	-----	0
PaCy	-----ARNSTYLLLLCPRVNNYKDSK-----QI	23
Gdil	-----	0
Phos2	FGVLHITGAFVLGTIATLAAQYAI CGSSCFTGGQQGSR SASAYSHQNQE VVTALAPPWVG	120
Phos1	-----MHS---L-----GLF-----ALIS---LLPYLVVAQRASTFAG	27
PcyA	-----MFS---L-----ILF-----ALLN---LVPH-IVGQPASTFAG	26
Pser	-----MFS---P-----TLL-----ALVI---LVPS-VLGQTASTFAG	26
PaCy	WGLQ---SPYELAMLS---V-----HLV-----YPSLLLFQQGVYAFPLGSI FAG	63
Gdil	-----MVFS---A-----SLV-----LVPL-LSLGVVRGSPAHASSFAG	30
	: . . . *	
Phos2	STESHQFPPPNPTNAFP-SLF--PSDVG YAGPTPTGAEAGVIATAPAYPMHTGQCSHELL	177
Phos1	ATTTAVFPPPNAGIAATDTNFPDGSKVGFPGPTRTGDEAAAIETAPVAAKVDSF--FPLI	85
PcyA	STTTAVFPPPNAGIAATDTNFPDGSVGFAGPTRTGDEAGAIATAPVIAKVDSH--FPLI	84
Pser	STTTAVFPPPNAGIAATDTNFPDGSVGFAGPTRTGDEAAAIATAPVAAKVDSH--FPLI	84
PaCy	STSTAAFPFPPGVTD SAIDSF FPDGSQVGFPGPTPTGDEPD A IATAPAVAKVDSI--FPLV	121
Gdil	ETTTFLFPFAGVTATATAFLDESEIGFAGPTPTGDEAF AIQTAPVIAKV DNI--FPLI	88
	* : *** . : : * * . : : *** * * . * * * . . . * :	
Phos2	KPASLYGEAKKDPEHNEAKGKSKFNLF RSWGNLSPWYSVDRGRFGVD-SSPDVPETCRV	236
Phos1	NG-----G-AED--STPMDPFV L VHLGNLSPFQSV PSSAFGLPGASPLIPEGCDI	133
PcyA	NG-----G-AED--SKKNEPFDVLLH L GNLSPFQSV PSSSFGLPDASPVIPQGCEI	132
Pser	NT-----G-AED--TKQNKPFV L THLGNLSPFQSV SSSAFGLPDASPVIPQGCEI	132
PaCy	KP-----A-AFDDRNKAKSSFV L QHLGSLSPWQSVE--SFGLPKASALIPAGCKL	169
Gdil	QP-----N-AED-SAKNKKPFN I L THLGNLSPWQSV DSSSFGLPNTSPVVP SGCEL	137
	: : . * : : * . * * : * * * : * : * : * :	
Phos2	TGLHFLHRHGARYPTAWASF GGP AKLGRKLH---RSPESWNASGDLEFLNGW TYKLGE EI	293
Phos1	VQAHLLHRHGARYPTADSG---PPGF AAKVNAAANS GSGFSAKGDL SFLNTW TYKLGGDI	190
PcyA	VQAYLIHRHGARYPTADSG---PPDFAAKINAA-ATGAGFSATGDLTFLNTW TYKLGG EI	188
Pser	VQAF LIHRHGARYPTADSG---PPDFAAKVHAA-ASGSGFSATGALSFLNTW TYKLGGDI	188
PaCy	QQVHLVHRHGARYPTGDAG---TGQFATNIHGA-AQNGTFSASGDL SFLNTW TYKLGA EI	225
Gdil	RQVHLAHRHGARYPTS DGV---TAGFAAKLHST-VTGSGFSASGALSFLNTW KYKLGA EI	193
	: : * * * * * . . : : : : . * . * * * * . * * * : *	
Phos2	LTPFGRQQLYDLGISLR I KYGFL LQNFT E KNTLPVFRTESQDRMLASAQNFAVGFFGY P-	352
Phos1	LTPFGRSQLFNLGVGFRVKYQ L LKGFK---NLPVFR TTSEARMLDSALHFATGFFGVQK	247
PcyA	LTPFGRSQLFNLGVGFRVKYQ L LKAFK---NLPVFR TTSEARMLDSALHFAAGFFGVQK	245

Pser	LTPFGRSQLFHLGVGFRVKYGELLKGFK--NLPVFRTTSEARMLDSALHFNAGFFGVQQ	245
PaCy	LTPFGRSQLFNLGVGFSVKYGELLKDFK--QKPVFRTTSEARMLDSALHFAAGFFGVQA	282
Gdil	LTPFGRSQLFELGVGFRIKYGDLLKDLT--DLPVFRTTSEERMIDSALHFAAGFFGVQT *****.***.***.: : *** **: : . ***** *: **: ** : * .*****	250
Phos2	LDGQYQQSITIEEDG-FNNTLSPYKTCPNAKIIHKSERGQWYIKRWANIYLKEAQKRLQK	411
Phos1	YQDSYHQLITIEHGGKQNNLTAPYESCTNGLNA-VAAFQDIQSQKWAQIYLAPAVKRLNA	306
PcyA	YQDSYHQLITIEHQGDQNNLTAPYETCVNGLND-ISLFGNVQSGKWAQIYLAPAVKRLNK	304
Pser	FQQDYHQLITIEHGGKQNNLTAPYENCANGLND-ISRYGDVQSAKWAQIYLAPAVARFNK	304
PaCy	YQEDYHQVITITETPG-QNNTLAPFFNCPNSNND-IGAFGVQQAQKWAQKYLQPTLKRSLP	340
Gdil	YQQDYHQLIMIETDG-QNNTLAPYENCPSNSNA-VASFGNTQANKWANVYLQPALKRSLP : .*: * * * * * *****: : . * * . . * : **: ** : * :	308
Phos2	QLHGIDLTIETTYMMQQLCPYETVALGYSKFCELFTEEEWEGFNYALDLQFWYGSFAFGSP	471
Phos1	NLRGLQLNVTDLFAMQQLCAFETVALGYSSFCDLFTEEEWRGFEYQSDLQFWYSFGPGNP	366
PcyA	NLQGLELNVTDLFAMQQLCAFETVALGYSAFCDLFTEDEWKAFFEYQSDLQFWYSFGPGNP	364
Pser	NLKGLEFNVTDLFAMQQLCAFETVALGFSEFCDLFTEDEWKSFEYQSDLQFWYSFGPGNP	364
PaCy	LIKGYTLQLADLIDMQQLCAYETVSLGFSDFCGVTFTEDEWKSFEYFWDLMFWYGNPGNP	400
Gdil	LLRGVNLTISDLVAMQELCAYETVSLGFSAFCGVTFTEEEWEGFEYFIDLQFWYGSFGPGNP : : * : : : **:* :***:*:* * * :***:*:*.* * * * * . * *	368
Phos2	VARVQGIGYVQEMVARLTNTPIQTHNSSTNATLNDNPITFPLGQSLYVDATHEVVVLNII	531
Phos1	ASSAMGIGYVQELVSRLTKTRITTFDITVNASIVTSDILFPLDQPIYVDATHDTILTAF	426
PcyA	ASSAMGIGYVQELVSRLTQTRITTFDITVNASIVTSDILFPLDQPIYVDATHDTILTAF	424
Pser	ASSAMGIGYVQELVSRLTQTRITTFDITSVNASIVTSDILFPLDQPIYVDATHDTILTAF	424
PaCy	STAAQGIGYVTELVSRLTQTPITTFDITVNASIVTSDILFPLDQPIYVDATHDTVLSTIY	460
Gdil	ATAAMGIGYVQELVSRLTQTRITTFDSAVNASIVTNPITLPLNQSIFVDASHDTVLSTFY : . ***** *:*.***:* * * .: : .***: . *****: : : :	428
Phos2	TALNLTSLFAGSGPLPYTHMDPNRTFRVSELAPFATNVQFQLECTST--PGQQIRVIIND	589
Phos1	AAMNLTTLAANGPLPTDHI PKGQTFANQLAPFAANVVGQVLSCPAS-SKPTHIRWIIND	485
PcyA	TAMNFTTLAANGPLPTDRI PKNQTFANQLAPFASNVGQVLSCPAS-TKPTHIRWVIND	483
Pser	AAMNFTTLAANGPLPTDHI PKDQTFANQLAPFAANVVGQVLSCPAS-TKPTHIRWVIND	483
PaCy	VAMNFTSLAANGPLPTDHI PKGQSYFVNQITPFATNLVGQVLSCPAS-EQPTHIRWILND	519
Gdil	VAMNFTSLAANGPLPTDHI PKDQTYFVNQLAPFASNLVGQVLSCPASSAKPTHIRWVIND .*:*.***:*.***** : : .: : : .: : :***:*: *:*.* : : **: :***	488
Phos2	GVVPLTGIRGCPEQKDGMCVPDVFVAAQKEIIKEVDWLYDCHGDWTVPEGTEWETVIGSP	649
Phos1	GVVPLTGIGCKPKDKNGMCEINTFIAGMKQRMQEIDFNFDCAFANYTVPVPDNI--VNGQY	543
PcyA	GVVPLTGIGCKEDKNGLCELDTFIAGMKQRIAEVDFNFDCFANYTIPIPDNI--INGQF	541
Pser	GVVPLTGINGCTANKDGLCELDATFIAGMKTRIAEVDYQFDCFADYTIPIPDNI--VNGQF	541
PaCy	GVPLPLTGIGCKANNDGLCELPFIAAMKQRIAEVDFDFGCFANYTVPNPDNI--VDGQL	577
Gdil	GVPLPLTGIGCKPNSDGLCDLDTFIAGMKQRIQEVDNFLGCFGNITVPIPDNI--VNGQF **:*:***.*** : :*: * : :*: * .*: * : : * :	546
Phos2	PKRA-----	653
Phos1	PQNLKPKKK-----	552
PcyA	PQNLKNKK-----	549
Pser	PQKSRK-----	547
PaCy	PLNLRVPRNCLLITMGSNQSLPKITPQDRAILDCLKQRDKLKQYQKKVCFVRNVATIEFS	637
Gdil	PAPKKKTF----- *	554
Phos2	-----	653
Phos1	-----	552
PcyA	-----	549
Pser	-----	547
PaCy	LVEVSVLHGLKQGNEVLKEIHKEMNVESVEKLLEESAEAREYQKEISDMLANNLSLDEED	697
Gdil	-----	554
Phos2	-----	653
Phos1	-----	552
PcyA	-----	549
Pser	-----	547
PaCy	DVQRELLALQEEIETEASHQIELPTVPNDVPVATVKEDSKVPASDERAKVAIPA	751
Gdil	-----	554

Pcub	MNLLLSIAT-LGLGLQAYAVMIGPSATLVIGNKNIAPDGIKRSAVLAGTSL--DTLSFPG	57
PaCy	MRRVAFG--AFSAFSSAYAAIGPVANLHIANKVISPDGFSRSASVLAGSNPSPGGTLTFPG	58
Gdil	MGSFASGLSFLLASANLVAGAIGPNTNLYIANKVISPDGYRSTVLAGANA--NSLQFPFG	58
PcyA	MRSLSNIIS--FASVLGVNAVIGPRANIFIGNKVIAPDGFNRSAVLAGDSP--YLSFPG	56
Pser	-----	0
Pcub	PVIRAT--KGDTLSLNVVNQLTDATMLMGTSIHWHGHFHQKGTSWADGVVGVTQCPIAPGH	115
PaCy	PVIRGT--PSSNFRLNVIDSLTDTSMRLRTTAIHWHGFFQHGSADGPVGATQCPIVPGD	116
Gdil	PLITGF--KGNTFRLNVIDNLTDTTMLTSTS IHWHGFLQEQS QWADGPVGVTQCPIAPGH	116
PcyA	PLIYALKSRGDSFSLNVVNELDSTM LKSTS IHWHGFLYQKSS WADGVVGVTQCPIALGH	116
Pser	-----MLTGTSIHWHGFFQKGTSWADGPVG VNCQPIAPNH ** * :*****.:*. *: **** **..****. ..	35
Pcub	SFLYQFPTANQAGTFWYHSHYSTQYCDGLRGALIVYDPTDPYRTWYDIDDESTIITLADW	175
PaCy	SFQYRFASAGQAGTFWYHSHHS SQYCDGLRGVMVVYDRRDPHRRLYDFDDESTIITLADW	176
Gdil	SFLYQFNVPDQAGTYWYHSHYQTQYCDGLRGALVIYDPLDPHRL LAVCP LDSTVITLADW	176
PcyA	SFLYQFSTANQAGSFYWYHSHYSTQYCDGLRGPMVVYDHFDPPYGRYDFDDESTVITLADW	176
Pser	SFLYQFSTTDQAGTFWYHSHYSTQYCDGLRGAMVVYDVLDPHRRLYDFDDESTIITLADW ** *:* .***: :*****.: :***** :::** **: :*:*****	95
Pcub	YHKAAPLQTLRTAKEDSVLINGQGRVPGDKTTDSTPLSVINIIPQKRYRFRLLISISCDPA	235
PaCy	YHTPAPIAGLVP-TPDSTLINGRGRYAGGP---TVPLSVIRVLPNKRYRFRVVNIGCDPN	232
Gdil	YHTPAPSAGLVP-ASVSTLLINGLRYAGG---TSPLAVIKVQH GKRYRFRLLVSISCDPN	231
PcyA	YHTPAPVAGLIP-TIDATLINGKGRYPGGP---ATPLSVITVVPNKRYRFRLLISISCDPA	232
Pser	YHTPAPSAGLVP-TSDATLINGKGRYAGGP---TSPLAVIRVLPNARYRFRLLVSLCDPN ** . ** * :.**** ** *. : **:** : *****.: :.* **	151
Pcub	FSFSIDGHSMTVIEADSQSVQPLTVNEITIFAGQRYSFILYANNPVGN YWIRSQPTY PDD	295
PaCy	VVFSIDGHTMTII EETV NVQPLVVD SIQIFAGQRYSVVHTNQPDNYWVR SNPN---L	289
Gdil	FMFSIDGHTMTVIEADAQNTQPLTVDSITYAGQRYSFILNANKPVGN YWIRALPN--GN	289
PcyA	FTFSIDGHSMTII EVDSENVQPLIVDEITLYAGQRYSFILYTIMPIGNY WIRSHPD--ED	290
Pser	FTFSIDGHS LTIIEVDS ES VQPLVVDQIQIFAGQRYSFILLTNQPIKNY WIRALPN--I : *****.:*:**.: : ..** *:* : :*****.: : * : ***.:* *	208
Pcub	GIQGYAGGINSAILRYS GAPAVNPPTTKASITI PLVEADLRPLYSPAAPGLPSPGAADV N	355
PaCy	GTTGFAGGLNSAILR YWGAPNDP TTT-STLVNPMLETNLVPLTSPAAPGIPSPGAADV N	348
Gdil	SPPGYDG GVN SAILR YVGAPNSDPT TT-SSLNPLYEPNLHLPTNA AAPGIARHG AADV N	348
PcyA	GPQGFE GGINSAIL RYLGA PAIDPG TT-SSRK NPLIETNL RPLT DPAAPGVPTLG AADV N	349
Pser	GTQGF DG GVN SAILR YWGAPNSDPT TT-SSV SAPLVETNLHLPTNPA APGPPTLG AADV S . *: **:***** ** :* *. : : *: * :* ** . **** *****.	267
Pcub	IKLDISYN SPSETFFVNNSTPEVPVPVLLQILSGAQ SANDLLPAGSVYTLPPNKVIEIS	415
PaCy	INLNIGFNFAGLVFEVNGAAFHPPTLPVLLQLISGTP-ASSLLPSGSIYTLPPGQVVEIS	407
Gdil	INLDIVFNTTELLFTVNNATFIPTVPVLLQILSGAKTAQELLPPGSVYVLPANKVIEIS	408
PcyA	INLDISFNNGTRKF AVNGATFHEHSV PVLLQILSGAQAATDLLPAGSVYTLPSNKVIELS	409
Pser	LNLNIVFDFASLK FQVNGATFTEAPVPVLLQILSGANTAADLLPAGSVYLLPPNKVIEIS ::*: * : : * **.:*: :*****:***: * .*** **:* ** .:~::~*	327
Pcub	MPGGRPGSPHPMHLGHDFS VVRSAGSNRYN ANPVRRDVNIGMEDT DNVTIRFKTD NS	475
PaCy	IPGGSVGSPHIPHLGHGVFDVRSAGSSTYNYANPIKRDVVNIGGA-GDNVTIRFTDNA	466
Gdil	MPGGAIGSPHIPHLGHAFSVRSANS SV NYHN PVKRDVVSIGLA-GDNTTIRFRTDNA	467
PcyA	MPGGTTGSPHPMHLGHGFS VIRSAGSEQNYVNPVKRDV VNLGRQPTDNVTIRFKTD NS	469
Pser	LPGGSIGSPHIPHLGHNF AVVRSAGSSTYNYANPVRRDVVSLGTETS DNVTIRFQTD NT :*** *****:***** * :***.*. ** **:*****.:* ** .***** **:	387
Pcub	GPWILHCHIDWHIEAGLAVVFTE DIPSIQFSNPPPAWDQLCPIFNAIPPQKFH----	528
PaCy	GPWIMHCHIDWHLEAGLSVIFAEDTATTSTMDPPTAWDDLCPKYEA FGPEFPE----	519
Gdil	GPWIMHCHIDWLHLQGLAVMAENIPGIKQTHPPSAWSQLCPIYDALPVQTFGAVEV	524
PcyA	GPWIMHCHIDWHLEAGLSVFAEDTPSIR SSTHPPDWDQLCPIFDALPHQTFN----	522
Pser	GPWIMHCHIDWHLAIGLAVFAENLPGIATSNOQPPAWDQLCPTFDALPQTF----- *****:*****: *****: *****: *****: *****: *****: *****: *****:*****: *****: *****: *****: *****: *****: *****:	438

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril	g	Erdbeschleunigung
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	mmu	milli mass unit
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure	MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
cps	counts per second, Zählimpuls pro Sekunde	ns	Nanosekunde
CV	Säulenvolumen	NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
ddH ₂ O	Deionisiertes Wasser	OD	Optische Dichte
DMT	Dimethyltryptophan	PCR	Polymerase Kettenreaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PLP	Pyridoxalphosphat
g	Erdbeschleunigung	PKS	Polyketidsynthase
Hz	Hertz	PCR	Polymerase Kettenreaktion
J	Joule	PLP	Pyridoxalphosphat
kDa	Kilodalton	RiPP	Ribosomal synthetisierte, posttranslational modifizierte Peptide
L	Liter	RNA	Ribonukleinsäure
MALDI	Matrix Assisted Laser Dissorption Ionisation	s	Sekunde
MeOH	Methanol	SEC	Größenausschlusschromatographie
MEP	Malzextrakt/Sojapepton (Medium)	T _m	Annealingtemperatur
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	TDC	Tryptophandecarboxylase
min	Minute	TOF	Time of flight

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturen einiger Sekundärmetabolite aus Basidiomyceten	5
Abbildung 2: Schematische Biosynthese von Orsellinsäure.....	8
Abbildung 3: Schematische Biosynthese des Cubebols	9
Abbildung 4: Schematische Biosynthese des Ferrichroms.....	9
Abbildung 5: Schematische Biosynthese des Pityriacitrins	10
Abbildung 6: Schematische Biosynthese des α -Amanitins.....	11
Abbildung 7: Orsellinsäure, Melleolid F, 6-Chloromelleolid F.....	13
Abbildung 8: Alle möglichen Zwischenstufen der Biosynthese des Psilocybins	15
Abbildung 9: Biosynthese des Psilocybins ausgehend von Tryptophan.....	16
Abbildung 10: In Agaricus bisporus gefundene Naturstoffe Agaritin, γ -Glutamyl-4-Hydroxyanillin und Xanthodermin	17
Abbildung 11: Putativer, enzymatischer Umsatz von Agaritin.....	18
Abbildung 12: Strukturformel von Bufotenin.....	75
Abbildung 13: HPLC-Profil von gereinigtem Bufotenin	77
Abbildung 14: FPLC-Profil des IEX-Laufes zur Reinigung der nativen Decarboxylase	79
Abbildung 15: FPLC-Profil des HIC-Laufes zur Reinigung der nativen Decarboxylase.....	79

Abbildung 16: FPLC-Profil des SEC-Laufes zur Reinigung der nativen Decarboxylase	80
Abbildung 17: HPLC-Profil des Assayextraktes des Decarboxylaseassays	80
Abbildung 18: Massenspurprofil des Assayextraktes des Decarboxylaseassays	81
Abbildung 19: FPLC-Profil des IEX-Laufes zur Reinigung der nativen Kinase	82
Abbildung 20: FPLC-Profil des HIC-Laufes zur Reinigung der nativen Kinase.....	83
Abbildung 21: FPLC-Profil des SEC-Laufes zur Reinigung der nativen Kinase	83
Abbildung 22: HPLC-Profil des Assayextraktes des Kinaseassays	84
Abbildung 23: FPLC-Profil des IEX-Laufes zur Reinigung der nativen Phosphatase	86
Abbildung 24: FPLC-Profil des HIC-Laufes zur Reinigung der nativen Phosphatase	86
Abbildung 25: FPLC-Profil des SEC-Laufes zur Reinigung der nativen Phosphatase.	87
Abbildung 26: HPLC-Profil des Assayextraktes des Phosphataseassays.	88
Abbildung 27: FPLC-Profil des IEX-Laufes zur Reinigung der nativen Laccase	90
Abbildung 28: FPLC-Profil des HIC-Laufes zur Reinigung der nativen Laccase.....	90
Abbildung 29: FPLC-Profil des SEC-Laufes zur Reinigung der nativen Laccase	91
Abbildung 30: HPLC-Profil des Assayextraktes des Laccaseassays.....	92
Abbildung 31: HPLC-Profil des Assayextraktes des Laccaseassays.....	92
Abbildung 32: HPLC-Profil des Assayextraktes des Phosphataseassays	95
Abbildung 33: Ausschnitt des Massenprofils der MALDI-TOF-Messung des blauen Farbstoffes	96
Abbildung 34: Ausschnitt des Massenprofils der MALDI-TOF-Messung des blauen Farbstoffes 2	97
Abbildung 35: UPLC-Profil des Assayextraktes des Glutamytransferaseassays mit Glu1	118
Abbildung 36: UPLC-Profil des Assayextraktes des Glutamytransferaseassays mit Glu2	119
Abbildung 37: Putative, enzymatisch vermittelte oxidative Dimerisierung von Bufotenin.....	127
Abbildung 38: Putative, enzymatisch vermittelte oxidative Polymerisation von Psilocin	127
Abbildung 39: Putatives Psilocinhexamer	128

Publikationen und Poster

Publikationen

Wick, J., Heine, D., Lackner, G., Misiek, M., Tauber, J., Jagusch, H., Hoffmeister, D.: *A Fivefold Parallelized Biosynthetic Process Secures Chlorination of Armillaria mellea (Honey Mushroom) Toxins*. Appl Environ Microbiol, 2016. **82**(4): p. 1196-204.

Lenz, C.*, **Wick, J.***, Hoffmeister, D.: Identification of ω -N-Methyl-4-hydroxytryptamine (Norpsilocin) as a Psilocybe Natural Product. *Journal of Natural Products* **2017** 80 (10), 2835-2838

*C. Lenz und J. Wick haben zu gleichen Teilen zur Publikation beigetragen.

Fricke, J., Lenz, C., **Wick, J.**, Blei, F., Hoffmeister, D. *Production options for psilocybin - the making of the magic*. Chemistry – A European Journal, 2018.

Blei, F., Fricke, J., **Wick, J.**, Slot, J. C., Hoffmeister, D. *Iterative L-tryptophan methylation in Psilocybe evolved by sub-domain duplication*. ChemBioChem, 2018.

Anteilsverteilung Autoren an den Publikationen

Wick, J., Heine, D., Lackner, G., Misiek, M., Tauber, J., Jagusch, H., Hoffmeister, D. (2016). A Fivefold Parallelized Biosynthetic Process Secures Chlorination of Armillaria mellea (Honey Mushroom) Toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 1196–1204

Wick, J.	Transformation von <i>E. coli</i> mit pMM13, pMM21, pHJ28, pHJ14, pHJ05, und pMM14, heterologe Herstellung von ArmH1-ArmH5 sowie der für den Assay benötigten Flavinreduktase, Aufreinigung und Analyse, <i>in-vitro</i> Produktbildungsassay, HPLC-Analytik, Mitarbeit bei der Erstellung des Manuskriptes.
----------	--

Heine, D.	Mitarbeit bei der Erstellung des Manuskriptes
-----------	---

Lackner, G.	Untersuchung zur Phylogenie flavinabhängiger Halogenasen
-------------	--

Misiek, M.	Herstellung der Konstrukte pMM13, pMM14 und pMM21
------------	---

Tauber, J.	Planung und Beaufsichtigung der Herstellung der Konstrukte pHJ05, pHJ14 und pHJ28
------------	---

Jagusch, H.	Herstellung der Konstrukte pHJ05, pHJ14 und pHJ28
-------------	---

Hoffmeister, D.	Planung des Projektes, Erstellung des Manuskriptes
-----------------	--

Lenz, C., **Wick, J.**, Hoffmeister, D. (2017). Identification of ω -N-Methyl-4-hydroxytryptamine (Norpsilocin) as a Psilocybe Natural Product. *Journal of Natural Products* **2017** 80 (10), 2835-2838

Lenz, C.	Reinigung des Norpsilocins, NMR-Analytik und –Auswertung, Mitarbeit bei der Erstellung des Manuskriptes
Wick, J.	Anzucht und Extraktion von <i>P. cubensis</i> , Extraktion von Norpsilocin aus Fruchtkörpern von <i>P. cubensis</i> , HPLC-Analytik, Mitarbeit bei der Auswertung der NMR-Daten, Mitarbeit bei der Erstellung des Manuskriptes
Hoffmeister, D.	Planung des Projektes, Erstellung des Manuskriptes

Fricke, J., Lenz, C., **Wick, J.**, Blei, F., Hoffmeister, D. *Production options for psilocybin - the making of the magic*. Chemistry – A European Journal, 2018.

Fricke, J.	Erstellung der Grafiken und Beitrag zum Manuskripttext
Lenz, C.	Erstellung der Grafiken und Beitrag zum Manuskripttext
Wick, J.	Beitrag zum Manuskripttext
Blei, F.	Beitrag zum Manuskripttext
Hoffmeister, D.	Planung des Projektes, Erstellung des Manuskriptes

Blei, F., Fricke, J., **Wick, J.**, Slot, J. C., Hoffmeister, D. *Iterative L-tryptophan methylation in Psilocybe evolved by sub-domain duplication*. ChemBioChem, 2018.

Blei, F.	Klonierung, Proteinproduktion und -charakterisierung
Fricke, J.	Gelfiltration, zusätzliche Proteincharakterisierung
Wick, J.	Extraktion und Analytik (HPLC-HRMS) der Extrakte aus <i>Psilocybe</i>
Slot, J. C.	Phylogenetische Untersuchungen
Hoffmeister, D.	Planung des Projektes, Erstellung des Manuskriptes

Poster

Fivefold redundant melleolide chlorination in the badidiomycete *Armillaria mellea*. 28. Irseer Naturstofftage 2016.

Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation zum Thema

„Untersuchungen zu Naturstoff-Biosynthesen von Basidiomyceten der Ordnung Agaricales“

Selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt. Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben, sind in der Danksagung der Dissertation oder den entsprechenden Manuskripten genannt. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Auch haben Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen, erhalten. Die Dissertation ist in gleicher oder ähnlicher Form von mir noch nicht als Arbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht worden.

Jena, den

Jonas Wick

Lebenslauf

- 04/2015-04/2018 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
Friedrich-Schiller-Universität Jena; Institut für Pharmazie; „Pharmazeutische Mikrobiologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Dirk Hoffmeister
- 03/2013-10/2013 **Anfertigung der Masterarbeit**
Friedrich-Schiller-Universität Jena; Institut für Pharmazie; „Pharmazeutische Mikrobiologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Dirk Hoffmeister
„Biochemical characterisation of melleolide biosynthetic Enzymes“
- 10/2011-10/2013 **Studium Master Chemische Biologie**
Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 09/2010-07/2011 **Auslandsaufenthalt**
Technisch-Naturwissenschaftliche Universität Norwegens, Trondheim.
Masterkurse im Bereich der Toxikologie und chemischen Analytik
- 06/2010-09/2010 **Anfertigung der Bachelorarbeit**
Georg-August-Universität Göttingen; Institut für physikalische Chemie;
„Physikalische Chemie fester Körper“ unter der Leitung von Prof. Dr. Götz Eckold
„Isotopenaustausch mit tritiummarkiertem Zucker“
- 10/2007-09/2010 **Studium Bachelor Chemie**
Georg-August-Universität in Göttingen

Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Dirk Hoffmeister bedanken. Er hat mir nicht nur die Möglichkeit gegeben die Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation in seinem Labor durchzuführen, sondern hat mich auch durch seinen fachlichen Rat und seine Expertise während dieser Arbeit stark unterstützt. Auch möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, eigene Ideen als Projekte im Rahmen dieser Arbeit verwirklicht haben zu können.

Meinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Mikrobiologie sei auch herzlich gedankt. Insbesondere die enge projektbezogene Zusammenarbeit mit Claudius Lenz, Janis Fricke, James Tauber und Felix Blei war für mich sehr lehrreich und produktiv.

Bei meinen externen Kooperationspartnerinnen und -partnern Dr. María García-Altares Pérez sowie Dr. Daniel Braga de Lima möchte ich mich für die lange, fachlich und menschlich sehr bereichernde Zusammenarbeit bedanken. Auch Andrea Perner und Heike Heinecke gebührt der Dank für die vielen HRMS bzw. NMR-Messungen.

Bei meiner Familie - meinen Eltern Dagmar und Markus Wick sowie meinen Schwestern Judith und Lea Wick - möchte ich mich für die langjährige Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion, insbesondere auch bei der Anfertigung der folgenden Arbeit, bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freundinnen und Freunden bedanken, welche mich mit fachlichem und menschlichem Rat all die Jahre unterstützt haben. Speziell im Rahmen dieser Arbeit ergeht dieser Dank besonders an Christine Eckes und Dr. Anna-Jorina Wicht für das Durchsehen dieser Arbeit sowie an Dr. Anne Dippel für die Literaturempfehlungen und Anmerkungen zu Kapitel 1.2.